



FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina

**ANÁLISIS POR SECUENCIACIÓN MASIVA DE LAS BASES
GENÉTICAS DE LA MIOCARDIOPATÍA DILATADA FAMILIAR
SOMETIDA A TRASPLANTE CARDIACO.**

Miocardopatía dilatada por mutaciones en BAG3 y Emerina.

TESIS DOCTORAL

Sofía Cuenca Parra

Madrid, 2015

Memoria de investigación presentada por

Sofía Cuenca Parra

Para optar al grado de

Doctora en Medicina

por la Universidad Autónoma de Madrid

Trabajo dirigido por:

Dr. Pablo García Pavía

Profesor Honorario, Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Madrid

Unidad de Insuficiencia Cardíaca y Cardiopatías Familiares

Servicio de Cardiología,

Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda

y por:

Dr. Luis A. Alonso-Pulpón Rivera

Profesor Titular, Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Madrid

Jefe de Servicio de Cardiología,

Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda

La presente tesis ha sido realizada en el Servicio de Cardiología del Hospital Universitario

Puerta de Hierro Majadahonda (Madrid, España)



A mi familia.

"Hermoso es lo que vemos. Más hermoso es lo que sabemos.

Pero mucho más hermoso es lo que no conocemos"

Niels Steensen.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es el resultado de una gran labor de equipo, y múltiples personas han contribuido, de uno u otro modo, a que este proyecto haya llegado a su fin. Desde estas líneas quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todos aquellos que durante estos años de trabajo me han acompañado: familia, amigos y compañeros que han hecho posible la realización de esta tesis.

En primer lugar agradezco al Dr. Pablo García Pavía, director de la Unidad de Cardiopatías Familiares del Hospital Puerta de Hierro, adjunto y profesor durante mis años de residencia, no sólo que aceptase dirigir mi tesis doctoral, sino que me mostrase este fascinante campo de la medicina y la cardiología. Su visión de futuro, su enorme capacidad creativa y su pasión por la investigación son un ejemplo para todos los que le rodean. El interés que han despertado en mí las enfermedades cardiovasculares hereditarias, durante la realización de éste y otros proyectos, ha motivado que mis siguientes pasos se dirijan a continuar mi vida profesional hacia este ámbito. Le estoy muy agradecida por la confianza y ayuda que me ha prestado siempre.

Agradezco de forma muy especial al Dr. Luis Alonso-Pulpón, Jefe del Servicio de Cardiología del Hospital Puerta de Hierro y figura fundamental en la historia del trasplante cardíaco en España, que aceptase codirigir esta tesis, y que haya constituido un ejemplo como profesional, como clínico y como persona en mi formación. Su carisma, su sentido de la justicia y su capacidad de cohesión han hecho posible que el Servicio de Cardiología que dirige sea lo que es hoy. Ha sido un honor aprender de su trabajo, y le agradezco su apoyo y confianza.

A todo el equipo de Trasplante Cardíaco del Hospital Puerta de Hierro, en especial al Dr. Javier Segovia y al Dr. Manuel Gómez Bueno. Agradezco su excelente labor asistencial, aportando cuidados y esperanza a tantos pacientes y familias con enfermedades como las que ocupan esta tesis, y haciendo hasta la más pequeña de sus acciones con la mayor diligencia y profesionalidad de la que se puede ser capaz. Su experiencia y trabajo incansable a lo largo de los años han conseguido que el nombre de *Puerta de Hierro* esté asociado al trasplante cardíaco de forma indisoluble.

A los compañeros de los Hospitales Doce de Octubre de Madrid (Dra. María J. Ruíz Cano, Dr. Alfonso Jurado) y Arraixaca de Murcia (Dr. Juan Ramón Gimeno-Blanes, Prof. Domingo Pascual-

Figal), por su excelente aportación a este proyecto y su colaboración en el ámbito de la investigación. Al personal del laboratorio Health in Code, donde se han realizado los estudios genéticos, por su disponibilidad y su rigor científico. A las doctoras Clara Salas del Servicio de Anatomía Patológica y María José Coronado, de Microscopía Confocal, por su profesionalidad y su gran trabajo en el análisis de muestras.

A la enfermera Ana Briceño, por su inigualable labor coordinadora, su exquisita atención y relación con los pacientes, y sobre todo por la energía y la alegría contagiosa con la que realiza todas sus tareas. Gracias por toda tu ayuda en este proyecto y fuera de él.

A todo el personal del Servicio de Cardiología de Puerta de Hierro: médicos, enfermeras, auxiliares y administrativos. Ha sido un inmenso placer haber compartido estos años de aprendizaje y experiencia con vosotros. Me siento muy orgullosa de haber formado parte de este equipo y lo recuerdo y tomo como ejemplo donde quiera que voy.

A toda mi familia. A mis padres por haberme apoyado y ayudado siempre. Por orientarme sin imponerme, por haberme dado libertad y haber respetado mis decisiones. Por haberme educado en valores, y haberme dado alas y raíces en la misma proporción.

Y a Arturo. Por ser mi compañía en todas las situaciones. Por ser capaz de enseñarme tanto y hacerme tan inmensamente feliz. Gracias.

Este trabajo ha podido ser realizado gracias a financiación procedente de los siguientes proyectos de investigación:

- **PI11/0699. Espectro genético y búsqueda de nuevos genes implicados en la Miocardiopatía Dilatada familiar sometida a Trasplante Cardíaco.** Instituto de Salud Carlos III.
- **RD012/0042/0015, RD012/0042/0049, RD012/0042/0066 y RD12/0042/0069.** Red Investigación Cardiovascular. Subprograma RETICS (Redes Temáticas de Investigación Cooperativa en Salud). Instituto de Salud Carlos III.
- **SAF2010-22153-C03-03.** Ministerio de Ciencia e Innovación.

Publicaciones y comunicaciones a congresos derivadas de este trabajo:

Artículos originales:

- S Cuenca, M J Ruiz-Cano, JR Gimeno-Blanes, A Jurado, C Salas, I Gomez-Diaz, L Padron-Barthe, JJ Grillo, C Vilches, J Segovia, D Pascual-Figal, E Lara-Pezzi, L Monserrat, L Alonso-Pulpon, P Garcia-Pavia. **Genetic basis of familial dilated cardiomyopathy undergoing heart transplantation.** (JHLT, en prensa).
- M Cobo-Marcos, S Cuenca, JM Gámez Martínez, B Bornstein, T Ripoll Vera y P Garcia-Pavia. **Utilidad del análisis genético de la miocardiopatía hipertrófica en la práctica real.** Rev Esp Cardiol. 2013 Sep;66:746-747.
- Ortiz-Genga MF, Cuenca S, Dal Ferro M, Zorio E, Salgado-Aranda R, Climent V, Duro-Aguado I, Hidalgo-Olivares VM, García-Campo E, Suárez-Mier MP, Barriales-Villa R, Gimeno-Blanes JR, Arad M, García-Pavía P, Monserrat L. **Radical [loss-of-function] mutations in FLNC gene produce a characteristic form of cardiomyopathy** (En preparación).

Comunicaciones a Congresos:

- Genetic basis of familial dilated cardiomyopathy undergoing heart transplantation.

A NGS study.

Cuenca S, Ruiz-Cano MJ, Jurado A, Gimeno-Blanes JR, Lara-Pezzi E, Cobo Marcos M, Segovia J, Pascual-Figal D, Alonso-Pulpon L, Garcia-Pavia P.
ESC Congress 2014, Barcelona.

- Clinical and histological characteristics of dilated cardiomyopathy due to BAG3 mutations.

Cuenca S, Garcia-Pavia P, Gimeno-Blanes JR, Salazar J, Rangel D, Cobo-Marcos M, Coronado MJ, Gomez-Bueno M, Segovia J, Alonso-Pulpon L.
Heart Failure Congress 2015/2nd World Congress on Acute Heart Failure 2015, Sevilla.

- Usefulness of genetic test in the hypertrophic cardiomyopathy in the real world.

Cobo Marcos M., Cuenca Parra S., Losada I., Guzzo Merello G., Gamez Martinez J.M., Bornstein B., Segovia J., Alonso Pulpon L., Ripoll Vera T., Garcia Pavia P.
ESC Congress 2013, Amsterdam.

- Características de la miocardiopatía dilatada por mutaciones en BAG3.

Cuenca Parra S, García-Pavía P, Gallego-Delgado M, Ruíz-Cano MJ, Pascual-Figal D, Gómez-Bueno M, Segovia Cubero J y Alonso-Pulpón L.
Congreso de las Enfermedades Cardiovasculares SEC 2014, Santiago de Compostela

- Espectro genético de la miocardiopatía dilatada familiar sometida a trasplante cardiaco.

Cuenca Parra S, García-Pavía P, Ruíz-Cano MJ, Jurado Román A, Gimeno Blanes JR, Pascual-Figal, Grillo-Pérez JJ y Alonso-Pulpón L.
Congreso de las Enfermedades Cardiovasculares SEC 2014, Santiago de Compostela

- Utilidad del análisis genético de la miocardiopatía hipertrófica en la práctica real.

Cobo Marcos M, Cuenca Parra S, Losada I, Gámez Martínez JM, Guzzo Merello G, Peraita Ezcurra M, Ripoll Vera T y García Pavía P.
Congreso de las Enfermedades Cardiovasculares SEC 2012, Sevilla

- Alcance del consejo genético entre los familiares de pacientes con MCH.

Cuenca Parra S, Cobo Marcos M, Guzzo G, Briceño A, Peraita M, García-Pavía P y Alonso-Pulpón L.

Congreso de las Enfermedades Cardiovasculares SEC 2012, Sevilla

Patentes derivadas de este trabajo:

- P201530298. Método de detección de predisposición a padecer cardiopatía dilatada.

Registrada: 10 Marzo 2015

Inventores: P García-Pavía, E Lara-Pezzi, S Cuenca, L Padron

Titularidad de la invención: Fundación Investigación Hospital Universitario Puerta de Hierro y Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC).

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	17
1.1 – Miocardiopatía Dilatada Idiopática. Concepto y epidemiología	17
1.2 – Criterios diagnósticos de Miocardiopatía Dilatada Idiopática.....	18
1.3 – Etiopatogenia de la Miocardiopatía Dilatada Idiopática	22
1.4 – Miocardiopatía Dilatada Familiar	27
1.5 – Bases genéticas de la Miocardiopatía Dilatada.....	31
1.6 – Next Generation Sequencing	39
1.7 – BAG3.....	40
1.8 – Emerina	42
2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO.....	45
2.1 - Objetivo Principal.....	45
2.2 - Objetivos Concretos.....	45
3. HIPÓTESIS DEL ESTUDIO.....	46
3.1 - Hipótesis Conceptuales.....	46
3.2 - Hipótesis Operativas.....	46
4. PACIENTES Y MÉTODOS.....	47
4.1 - Pacientes a estudio.....	47
4.2 - Evaluación genética.....	48
4.3 - Evaluación familiar	54
4.4 - Evaluación anatomopatológica	54
4.5 - BAG3: Microscopía confocal	55

4.6 - Análisis de haplotipos en los portadores de mutaciones	
Emerina c.77T> C.....	56
4.7 - Análisis estadístico.....	56
5. RESULTADOS.....	57
5.1 – Características clínicas e histopatológicas de la MCD sometida a TxC ...	57
5.1.1 - Características clínicas.....	57
5.1.2 - Características histopatológicas.....	57
5.2 - Resultados genéticos	67
5.2.1- Resultados genéticos iniciales	67
5.2.2 - Evaluación familiar	67
5.2.3 - Resultados genéticos finales.....	75
5.2.4 - Emerina.....	76
5.3 - Características clínicas e histopatológicas de acuerdo a los hallazgos genéticos.....	77
5.4 - BAG3.....	82
5.4.1 - Análisis clínico.....	82
5.4.2 - Análisis histológico.....	84
6. DISCUSIÓN.....	88
6.1 - Bases genéticas de la MCD familiar sometida a TxC.....	88
6.2 - Efecto de mutaciones múltiples en MCD.....	89
6.3 - Rendimiento del análisis genético por NGS e importancia de la evaluación familiar	90
6.4 - Implicaciones clínicas	92
6.5 – Limitaciones	93

7. CONCLUSIONES.....	94
-----------------------------	-----------

RESUMEN.....	96
---------------------	-----------

APENDICES.

Apéndice 1. Árboles familiares de los pacientes con trasplante cardiaco por MCD incluidos en el estudio.....	101
---	------------

BIBLIOGRAFIA.....	154
--------------------------	------------

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS:

TABLAS:

Tabla 1. Causas mayores de Miocardiopatía Dilatada: diagnóstico diferencial	21
Tabla 2. Etiologías causantes de MCD	26
Tabla 3. Causas genéticas MAYORES de MCD	32
Tabla 4. Causas genéticas menores de MCD	34
Tabla 5. Genes analizados en el estudio	49
Tabla 6. Características clínicas y familiares de los pacientes índice	58
Tabla 7. Características clínicas basales de la población a estudio en el momento de la evaluación cardíaca inicial	64
Tabla 8. Características histopatológicas de los pacientes índice	65
Tabla 9. Características histopatológicas resumidas	66
Tabla 10. Variantes genéticas inicialmente clasificadas como mutaciones patogénicas	68

Tabla 11. Variantes genéticas inicialmente clasificadas como variantes de significado incierto	70
Tabla 12. Variantes genéticas en genes no relacionados con MCD	73
Tabla 13. Hallazgos clínicos e histológicos de los receptores de TxC por MCD familiar de acuerdo a los hallazgos genéticos: pacientes con mutaciones patogénicas vs pacientes sin mutaciones patogénicas	78
Tabla 14. Hallazgos clínicos e histológicos de los receptores de TxC por MCD familiar de acuerdo a los hallazgos genéticos: pacientes con mutaciones múltiples vs pacientes sin mutaciones múltiples	80
Tabla 15. Características de pacientes con mutaciones en BAG3.....	83
Tabla 16. Características diferenciales de portadores asintomáticos y afectados	83

FIGURAS:

Figura 1. Clasificación de las miocardiopatías según la Sociedad Americana del Corazón.

Clasificación de las miocardiopatías según la Sociedad Europea de Cardiología 24

Figura 2. Diagrama de flujo para el estudio de MCD 30

Figura 3. Genes relacionados con MCD. 35

Figura 4. Gen BAG3 y su localización en la célula cardíaca. 41

Figura 5. Gen EMD y su localización en la célula cardíaca. 44

Figura 6. Ejemplos de cosegregación, árboles genealógicos de 3 familias
seleccionadas 53

Figura 7. Resultados genéticos finales..... 75

Figura 8. Haplotipo compartido en las regiones en torno al gen EMD en los pacientes
portadores de la mutación c.77T>C..... 76

Figura 9. Microscopía confocal en los 3 pacientes con mutaciones en LMNA y TTN.... 85

Figura 10. Microscopía confocal en los 3 pacientes con mutaciones en BAG3..... 86

Figura 11. Microscopía confocal en el paciente #12 a alto aumento..... 87

**ANÁLISIS POR SECUENCIACIÓN MASIVA DE LAS BASES GENÉTICAS DE LA
MIOCARDIOPATÍA DILATADA FAMILIAR SOMETIDA A TRASPLANTE
CARDIACO**

Miocardopatía dilatada por mutaciones en BAG3 y Emerina

1. INTRODUCCIÓN

1.1 – Miocardiopatía Dilatada Idiopática. Concepto y epidemiología.

La miocardiopatía dilatada idiopática (MCD) es una enfermedad del músculo cardíaco caracterizada por dilatación y disfunción sistólica del ventrículo izquierdo, en ausencia de condiciones de carga anormales, como hipertensión arterial, enfermedad coronaria o valvulopatías [1-6] . La afectación del ventrículo derecho puede estar presente, aunque no es necesaria para el diagnóstico. Los pacientes afectados por esta entidad pueden o no desarrollar insuficiencia cardíaca evidente, presentar arritmias, tanto auriculares como ventriculares, y sufrir muerte súbita cardíaca.

La MCD es la causa más frecuente de insuficiencia cardíaca en el paciente joven[7], y de trasplante cardíaco en el mundo[8, 9].

Hay escasos datos poblacionales publicados acerca de la prevalencia de la MCD a nivel mundial, pero varía claramente con la edad y el área geográfica[1]. En estudios realizados en la década de los 90, se refería una incidencia de hasta 5-8 casos por cada 100.000 habitantes, y una prevalencia de unos 36 casos por 100.000 habitantes[4]. En EEUU la MCD es la responsable de unas 46.000 hospitalizaciones y 10.000 muertes cada año, y es la causa de hasta el 25% de los casos de insuficiencia cardíaca crónica[10]. En Europa, esta entidad causa unas 10.000 muertes al año. En los últimos estudios, sin embargo, las cifras de prevalencia aumentan hasta cifras tan sorprendentes como un caso por cada 250 habitantes en algunas series[11, 12], revelando una mejora en las técnicas de diagnóstico y un mayor conocimiento de esta enfermedad. Incluso estos nuevos datos de prevalencia podrían estar infraestimados, puesto que en torno al 14% de los pacientes con MCD pueden permanecer asintomáticos y por tanto no diagnosticados[10].

1.2 – Criterios diagnósticos de Miocardiopatía Dilatada Idiopática.

La MCD implica la aparición de dilatación y disfunción sistólica de ventrículo izquierdo, acompañada o no de fallo de ventrículo derecho, en ausencia de cualquier factor que pudiera causar afectación ventricular.

El diagnóstico de esta entidad se realiza por tanto cuando se cumplen las siguientes condiciones[2, 3, 9]:

- Diámetro telediastólico de ventrículo izquierdo (DTDVI) > 2 desviaciones estándar para el previsto ajustado por edad y superficie corporal. En la práctica se utiliza la fórmula publicada por Henry et al[13], y se consideran dilatados ventrículos cuyo diámetro telediastólico supera el 117% del predicho por este cálculo (que corresponde a 2 desviaciones estándar del límite más un 5%).
- Fracción de acortamiento de ventrículo izquierdo < 25% (2 desviaciones estándar) y/o fracción de eyección de ventrículo izquierdo (FEVI) < 45% (2 desviaciones estándar) diagnosticada por prueba de imagen (ecocardiografía, SPECT cardiaco, ventriculografía o resonancia magnética cardiaca).

La miocardiopatía dilatada idiopática es en realidad un diagnóstico de exclusión, por lo que para establecer su diagnóstico es necesario descartar causas primarias o secundarias de miocardiopatía dilatada (Tabla 1).

Para el diagnóstico de esta entidad, por tanto, debemos realizar ciertas pruebas diagnósticas que permitan excluir las etiologías mencionadas:

- La coronariografía es la primera prueba fundamental que debe realizarse en estos pacientes, ya que la cardiopatía isquémica es la otra gran causa de insuficiencia cardiaca por disfunción sistólica en nuestro medio, y su diagnóstico tiene grandes implicaciones terapéuticas y pronósticas. En cuanto al tratamiento, algunos fármacos indicados en cardiopatía isquémica, como son los antiagregantes e hipolipemiantes, no lo son en la miocardiopatía dilatada

idiopática, y los criterios de implante de desfibrilador, para tratamiento de arritmias ventriculares, varían ligeramente entre ambas entidades. Además, el pronóstico en estos pacientes es peor que en la miocardiopatía dilatada idiopática. Por otro lado, las implicaciones familiares no son las mismas que respecto a la MCD. El diagnóstico de enfermedad coronaria, si bien podría hacerse mediante pruebas indirectas, requiere la visualización de las arterias coronarias, ya que la MCD se excluye ante lesiones de más del 50% del diámetro luminal en una rama principal, por lo que la coronariografía o, con algo menos evidencia, el escáner de arterias coronarias, son fundamentales para el diagnóstico[14]. Las pruebas de detección de isquemia no son fiables en esta entidad, ya que los pacientes con miocardiopatía dilatada idiopática pueden tener alteraciones de perfusión que den lugar a equívoco[15].

Otras exploraciones y pruebas que debemos realizar para el estudio de una miocardiopatía dilatada, o condiciones que deben descartarse previo a su diagnóstico, son las siguientes[16]:

- Despiñaje de hipertensión arterial: la miocardiopatía dilatada idiopática se excluye ante cifras de TA > 160/100 mmHg documentadas y confirmadas en mediciones repetidas, y/o evidencia de daño en órganos diana[17].
- Historia de consumo crónico de alcohol con cifras de > 80 gramos al día durante al menos 5 años [18, 19].
- Déficit nutricionales
- Arritmias supraventriculares rápidas, sostenidas y sintomatológicas.
- Enfermedades sistémicas asociadas a miocardiopatía dilatada.
- Enfermedades del pericardio.
- Cardiopatías congénitas.
- Cor pulmonale.

Entre las causas de miocardiopatía dilatada adquirida cabe destacar, además de los déficits nutricionales y alteraciones endocrinológicas, el efecto secundario de fármacos cardiotóxicos,

como las antraciclinas y el trastuzumab, cada vez más frecuentes por los tratamientos quimioterápicos[20].

Esta enfermedad también puede ocurrir de forma tardía tras una infección e inflamación cardíaca crónica, cursando en estos pacientes con células de inflamación crónica en la biopsia cardíaca, dilatación de ventrículo izquierdo y fracción de eyección deprimida. En estos casos la histología y la inmunohistoquímica son necesarias para el diagnóstico. Una proporción no desdeñable de pacientes con miocardiopatía dilatada inflamatoria pueden tener proteínas virales en el miocardio, incluso en ausencia de inflamación[1].

Aunque los especialistas diagnostiquen a un paciente de miocardiopatía dilatada “idiopática” o de causa desconocida, siempre subyace una causa etiológica, aunque no detectada. En un estudio publicado en el año 2000, se estudiaba la etiología de la dilatación ventricular en una cohorte de 1238 pacientes con miocardiopatía dilatada inicialmente inexplicada. El porcentaje de pacientes con miocardiopatía dilatada idiopática tras el estudio fue del 50%, seguido de otras causas menos frecuentes como miocarditis, cardiopatía isquémica no previamente diagnosticada, enfermedades de depósito, miocardiopatía periparto, hipertensión, infección por VIH, enfermedades del tejido conectivo, drogas o quimioterápicos. El pronóstico de estos pacientes variaba en función de la etiología, siendo mayor la supervivencia en la miocardiopatía periparto y la miocardiopatía idiopática, respecto a otras entidades [21].

Por todos estos motivos, las pruebas a realizar en todo paciente con miocardiopatía dilatada, si bien dependen de la sospecha diagnóstica, deben excluir la presencia de causas identificables de dilatación y disfunción de ventrículo izquierdo, antes de etiquetar como “idiopática” la enfermedad.

Tabla 1 : Causas mayores de Miocardiopatía Dilatada: diagnóstico diferencial**1. Cardiopatía Isquémica****2. Enfermedades infecciosas:**

- Virus: Adenovirus, virus Coxsackie, Citomegalovirus, VIH, virus de la gripe, Varicela, Hepatitis, Epstein-Barr, Echovirus, Parvovirus, entre otros.
- Bacterias: Estreptococo, Fiebre Tifoidea, Difteria, Brucelosis, Psitticosis, Rickettsiosis (leptoespirosis, sífilis), Enfermedad de Lyme, hongos y micobacterias (histoplasma, criptococo).
- Parásitos: Tripanosoma cruzi (Enfermedad de Chagas), toxoplasmosis, esquistosomiasis, triquinosis.

3. Enfermedades de depósito: hemocromatosis y amiloidosis.**4. Fármacos:**

- Quimioterápicos: antraciclinas, ciclofosfamida, trastuzumab, adriamicina.
- Antirretrovirales: zidovudina, didanosina, zalcitabina.
- Otros: fenotiazinas, cloroquina, clozapina, metilsergida

5. Tóxicos:

- Drogas: alcohol, cocaína, anfetaminas.
- Metales: cobalto, litio, mercurio, plomo, berilio.
- Gases: monóxido de carbono.

6. Déficits nutricionales: tiamina, selenio, carnitina, niacina (pelagra).**7. Enfermedades inflamatorias y autoinmunes: LES, sarcoidosis, dermatomiositis, escleroderma, AR, arteritis de células gigantes, enfermedad de Kawasaki.****8. Enfermedades endocrinológicas: hiper o hipotiroidismo, exceso o déficit de hormona del crecimiento, feocromocitoma, DM, Cushing.****9. Enfermedades genéticas, con o sin afectación neuromuscular: Miocardiopatía Dilatada Idiopática (esporádica o familiar), distrofia muscular de Duchenne, Beker, miotónica y Ataxia de Friedreich.****10. Miscelánea: Miocardiopatía periparto, taquimiocardiopatía, post radiación, SAOS, golpe de calor, hipotermia.**

1.3 – Etiopatogenia de la Miocardiopatía Dilatada Idiopática

La MCD se engloba dentro de las llamadas miocardiopatías, enfermedades primarias del músculo cardíaco[22]. Desde las primeras definiciones, el concepto de “miocardiopatías” ha ido variando, definiéndose en 1980 como “enfermedades del músculo cardíaco de causa desconocida”, para distinguirlas de la disfunción cardíaca debida a causas conocidas como hipertensión, cardiopatía isquémica y enfermedad valvular[2]. Sin embargo, en la práctica clínica se seguía utilizando el término “miocardiopatía” para referirse a entidades de causa cardiovascular. Por tanto, en 1995, la Organización Mundial de la Salud expandió la definición para incluir todas las enfermedades que afectan al músculo cardíaco, teniendo en cuenta además la etiología[3]. Se definieron como “enfermedades del miocardio asociadas a disfunción cardíaca”, y se clasificaron en 5 grandes grupos de acuerdo a su anatomía y fisiología, pudiendo estar originados por distintas etiologías, como viral, genética, tóxica, y también enfermedad coronaria, valvular e hipertensiva.

En el año 2006 la Asociación Americana del Corazón propuso una definición y clasificación contemporánea de las miocardiopatías[23]: en este consenso se definieron las miocardiopatías como un conjunto heterogéneo de enfermedades del miocardio asociadas a disfunción mecánica y/o eléctrica, debidas a causas habitualmente genéticas, que pueden estar limitadas al corazón o formar parte de enfermedades sistémicas, y que habitualmente abocan a fallo cardíaco o muerte cardiovascular. Se dividían en dos grupos: primarias, con afectación predominantemente cardíaca, y secundarias, acompañadas de alteraciones en otros órganos. Las miocardiopatías primarias se dividían según su causa en genéticas, mixtas (predominantemente de causa no genética) o adquiridas. Las genéticas incluían la miocardiopatía hipertrófica, miocardiopatía arritmogénica, miocardiopatía no compactada, mitocondriales y canalopatías entre otras, quedando la miocardiopatía dilatada, junto con la restrictiva, en el grupo de etiología mixta. Entre las adquiridas se incluían la miocarditis, la

miocardiopatía de estrés (Síndrome de Tako-tsubo), la miocardiopatía periparto y la taquimiocardiopatía.

No fue hasta 2008 cuando la Sociedad Europea de Cardiología publicó un documento en el que se proponía una clasificación eminentemente práctica, enfocada a la clínica[1], y que definía las miocardiopatías como alteraciones miocárdicas con anormalidad estructural y funcional del músculo cardíaco, en ausencia de enfermedad coronaria, hipertensión arterial, enfermedad valvular o cardiopatías congénitas suficientes para explicar las alteraciones. Esta clasificación coincide con la propuesta con la AHA, difiriendo ambas de la propuesta por la OMS en que se excluye explícitamente la cardiopatía debida a causa isquémica, hipertensiva y valvular. Sin embargo, respecto a la propuesta por la AHA en 2006, se diferencia en la exclusión de las canalopatías.

En este consenso de 2008 se dividían las miocardiopatías en cinco grandes grupos (Figura 1); miocardiopatía hipertrófica, dilatada, arritmogénica, restrictiva e inclasificable. A su vez, estos grupos pueden tener etiología genética/familiar o no genética.

Por último, en 2013 la Federación Mundial del Corazón publicó una clasificación de las miocardiopatías inspirada en la clasificación TNM para tumores, la clasificación MOGE(S)[24, 25], en la que cada entidad recibía 5 atributos:

M: morfofuncional, expresa el fenotipo (por ejemplo, miocardiopatía dilatada: M_D)

O: órgano afecto (por ejemplo, afectación de corazón y músculo: O_{H+M})

G: transmisión genética (por ejemplo, autosómica dominante: G_{AD})

E: etiología, describe la causa específica (por ejemplo, mutación en la Titina: $E_{G-TTN(p. Glu4018*)}$)

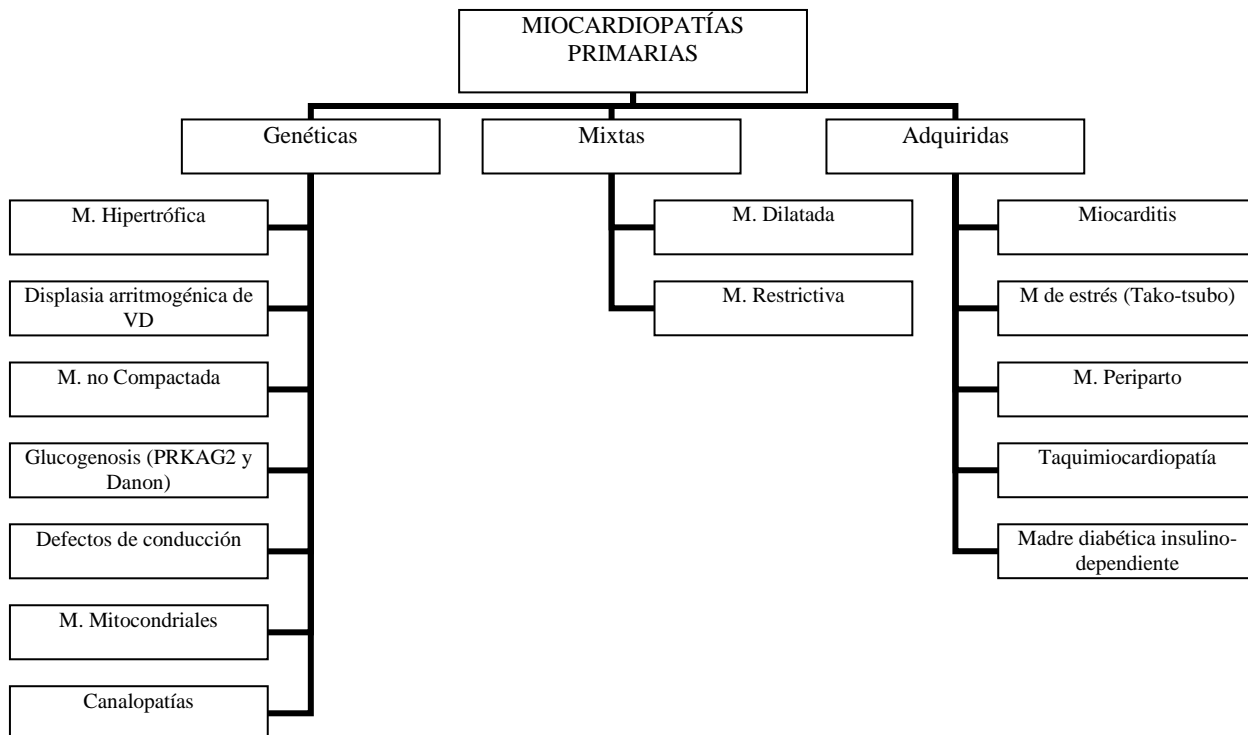
S: clase funcional (parámetro opcional) (por ejemplo, clase funcional de la New York Heart Association III: S_{C-III})

Por el momento esta clasificación no ha modificado la práctica clínica, aunque podría hacerlo en el futuro.

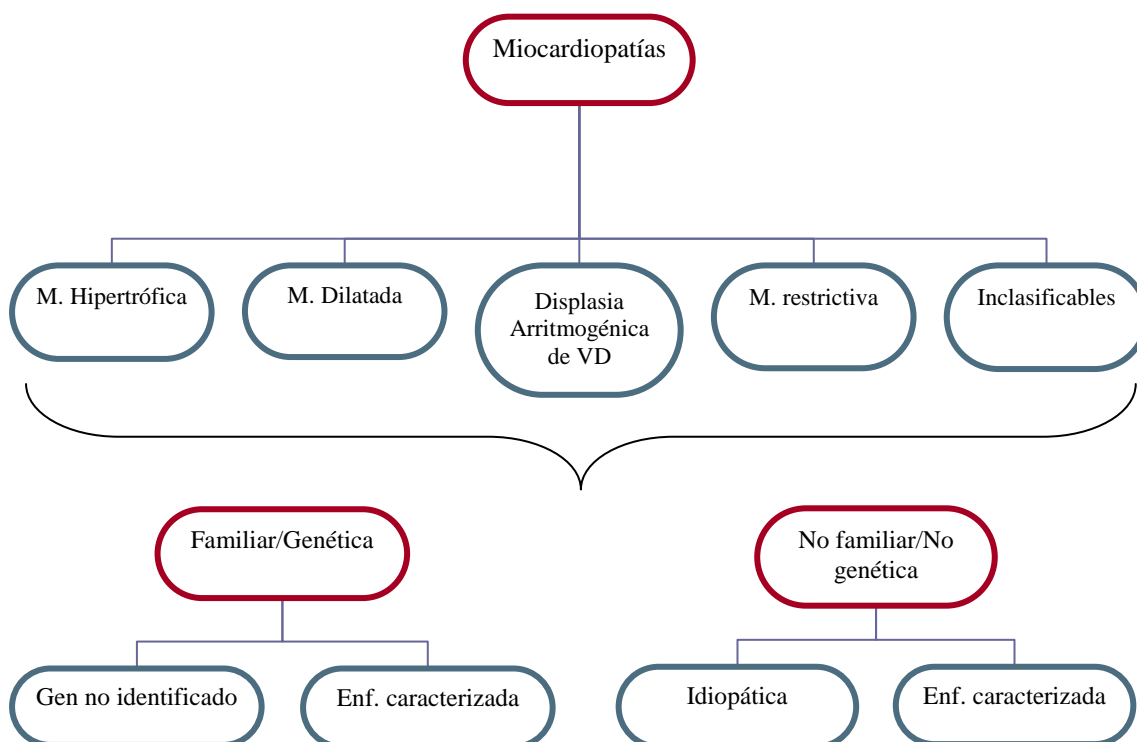
Figura 1. A. Clasificación de las miocardiopatías según la Sociedad Americana del Corazón[23].

B. Clasificación de las miocardiopatías según la Sociedad Europea de Cardiología[1].

A.



B.



En el documento de 2008 de la Sociedad Europea de Cardiología se proponían causas familiares y no familiares como causantes de MCD (Tabla 2)[1], y la etiopatogenia de la dilatación y disfunción cardíaca variaba según el mecanismo causal. En términos globales, pasa por una disfunción de las células cardíacas, ya sea por una mutación que impide la correcta expresión de las proteínas que las componen, o por un daño adquirido, que ocasiona una progresiva dilatación del ventrículo izquierdo, que en un inicio puede ser compensatoria por el mecanismo de Frank-Starling, pero que finalmente conduce a una pérdida de función contráctil y disfunción sistólica con fallo de bomba[26]

Las teorías sobre el mecanismo de acción de las mutaciones en las miocardiopatías se resumen en variantes de dos hipótesis principales:

- Por un lado está la teoría del "péptido maligno" acuñada por Moolman en el año 2000[27]. Según esta hipótesis, la presencia de una proteína anómala causaría una alteración en la función del sarcómero causando alteraciones morfológicas y contráctiles.
- Por otro lado, otra teoría desarrollada en 2009 por Carballo, es la de la "haploinsuficiencia"[28]: la falta de una adecuada concentración de la proteína impediría la normal función contráctil de la célula cardíaca.

Ambas hipótesis tienen cabida en la época actual, en la que se conocen con más amplitud los mecanismos causales de varias mutaciones concretas y su efecto sobre el cardiomiocito.

Tabla 2: Etiologías causantes de MCD

FAMILIARES	NO FAMILIARES
Familiar, gen no identificado	Miocarditis (infecciosa/tóxica/inmune)
Mutaciones en genes sarcoméricos	Enfermedad de Kawasaki
Genes de la banda Z: Proteína LIM muscular, TCAP	Eosinofílica (Sd. Churg Strauss)
Proteínas del citoesqueleto: Distrofina, Desmina, Metavinculina, Complejo sarcoglicano, CRYAB, Epicardina	Virus crónicos
	Drogas
Genes de la membrana nuclear: Lamin A/C, Emerina	Embarazo
	Enfermedades endocrinológicas
Mutaciones en genes desmosómicos	Nutritionales — tiamina, carnitina, selenio, hipofosfatemia, hipocalcemia
Mitocondriales	Alcohol
	Taquiomiopatía

1.4 – Miocardiopatía Dilatada Familiar

Hasta los años 80 la miocardiopatía dilatada se consideraba eminentemente una enfermedad esporádica; la MCD familiar se entendía como una enfermedad de diferente etiología y de baja frecuencia. Fue en esta década cuando se empezaron a considerar las bases genéticas de esta entidad, y a considerarse la posibilidad de que tanto la forma esporádica como la familiar presentaran mecanismos etiopatogénicos comunes. Además, la disponibilidad de las técnicas de imagen ecocardiográficas permitió estudiar más detalladamente a los familiares de pacientes con MCD.

En términos de frecuencia, la primera referencia en la literatura aparece en el año 1981, en un artículo de Fuster[29], en el que se establecía que el porcentaje de MCD de origen familiar era del 2%. Este y otros artículos publicados en los años siguientes basaban sus datos en la historia familiar, obtenida bien mediante análisis retrospectivo de historias clínicas o cuestionarios telefónicos, o bien mediante estudios prospectivos. En estos trabajos, se describían tasas de MCD familiar del 2-7% de los pacientes con MCD[30-33].

Cuando se incorpora al análisis el screening familiar con ecocardiografía, los porcentajes de MCD familiar aumentan considerablemente: en 1988, un pequeño estudio prospectivo [34] documentó una tasa de MCD familiar del 33%. En población pediátrica, en ese mismo año, se documentaba historia familiar en el 25% de las MCD[35]. En 1992, Michels et al[36], publicaron un estudio prospectivo en el que se realizaba evaluación clínica, electrocardiograma y ecocardiograma (y coronariografía si presentaban MCD y eran mayores de 40 años) a 315 familiares de 59 sujetos con MCD. Si bien la etiología familiar sólo se sospechaba inicialmente en 3 de ellos (5%), se documentó MCD en 18 familiares de 12 de los pacientes índice, con una tasa de MCD familiar del 20,3%. Además, 22 de los 240 familiares sanos, presentaban volúmenes de ventrículo izquierdo altos en comparación con controles, en posible relación con estadios iniciales de la enfermedad.

Dos artículos publicado en 1995 y 1997[37, 38], realizando también screening con ecocardiograma, introdujeron los términos de MCD familiar “posible” y “definitiva”, con unos porcentajes de 27-28% de MCD familiares posibles y 24-25% de definitivas. En este último artículo, se definió MCD familiar “definitiva” cuando al menos dos familiares de primer grado presentaban MCD, y “posible”, si un paciente con MCD tenía antecedentes de primer grado en un sujeto menor de 50 años, o si un familiar presentaba fracción de eyección de VI menor de 50% o DTDVI superior a dos desviaciones estándar del predicho por la fórmula de Henry[13]. Sumando los porcentajes de MCD familiar posible y definitiva, en este estudio realizado en 56 pacientes se obtenía una tasa de MCD familiar del 52%.

Similares porcentajes aparecen publicados en los años siguientes hasta la actualidad, con rangos de entre 35-65% de MCD familiar[39-48]. En alguno de estos artículos, además, se comenta la expresividad edad-dependiente de esta enfermedad. En un estudio publicado en 2003, se siguieron 431 familiares de primer grado sanos de pacientes con MCD esporádica o familiar[43]; de entre los 127 parientes en los que se realizó seguimiento con ecocardiograma, el 7% desarrolló MCD en 10 años. No se encontraron diferencias significativas respecto a si los casos índice presentaban MCD familiar, sin embargo, la detección de valores ecocardiográficos de volúmenes sistólico y diastólico de ventrículo izquierdo en límites altos de la normalidad parecía prever el desarrollo ulterior de MCD. En otro estudio, en 2005[44], se evaluaron 767 familiares de pacientes con MCD durante 5 años, objetivando anormalidades en el ecocardiograma (volúmenes altos de ventrículo izquierdo o fracción de eyección deprimida sin dilatación) de un 23% de familiares aparentemente sanos. Además, se objetivó una tasa de progresión a MCD en 5 años del 10% en estos sujetos con alteraciones ecocardiográficas, frente al 1,3% en los familiares con ecocardiograma absolutamente normal. La mediana de edad de progresión fue de 38 años.

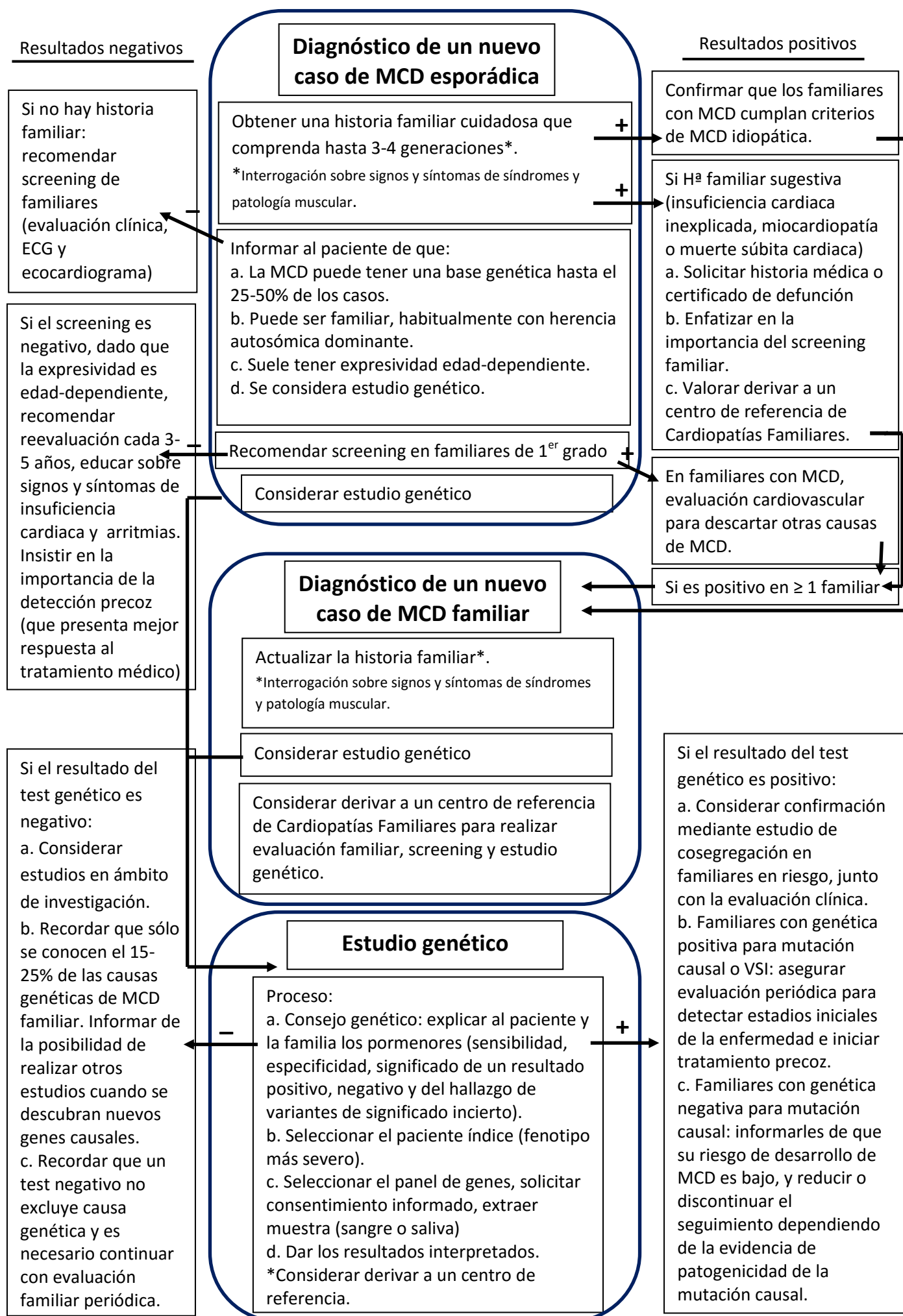
De estos estudios se infiere la importancia de realizar screening inicial a familiares de sujetos con MCD, y de mantener posteriormente un seguimiento regular de estos pacientes. El

consenso es que este seguimiento debe hacerse cada 3-5 años con electrocardiogramas y ecocardiogramas seriados[49, 50].

En lo que respecta a la evolución clínica, no parece difiera entre MCD familiares y esporádicas. En un estudio prospectivo a 5 años, publicado en 2003[51], se evaluaba la evolución clínica de MCD familiares y esporádicas, en una cohorte de 99 pacientes, sin encontrar diferencias significativas en cuanto a mortalidad o deterioro de la fracción de eyección de VI. En otro análisis, en 2006 [52], se estudió una serie de 304 pacientes con MCD (125 con MCD familiar confirmada, 48 con MCD familiar probable, 72 posible y 59 aparentemente esporádica). La evolución clínica tanto de los probandos como de los familiares que se diagnosticaron durante el screening fue similar entre los distintos grupos, con una edad media de inicio de 40-46 años, un tiempo hasta el diagnóstico de 5-6 años, y un tiempo medio hasta el evento combinado de muerte o trasplante de 4-6 años.

Dado que la etiología de la MCD en la mayor parte de los casos es genética, el conocimiento cada vez más amplio de los genes causales, y la posibilidad de llevar a cabo screening genético de familiares, podrá modificar el seguimiento clásico de estos pacientes.

En la Figura 2 se muestra un diagrama de flujo para el estudio de pacientes con diagnóstico de MCD.

Figura 2: Diagrama de flujo para el estudio de MCD (Modificado de Hersberger et al.⁴⁶)

1.5 – Bases genéticas de la Miocardiopatía Dilatada

La primera descripción de MCD en relación con una mutación genética data de 1999, cuando se describió que una alteración missense en el gen de la Lamina podía ser causa de MCD[53]. Tras este estudio se sucedieron otros, y en los años siguientes se describieron hasta 25 genes relacionados con MCD[48, 54, 55], la mayoría de ellos codificando para proteínas del citoesqueleto, membrana nuclear o proteínas sarcoméricas. La técnica utilizada para la evaluación genética era la secuenciación por Sanger, y por tanto los estudios evaluaban un número limitado de genes, llegando a determinar la mutación causal en sólo un 17-27%, o alrededor del 25% si se consideraban sólo los casos de MCD familiar[56-60]. Es notable señalar que el mayor estudio realizado con técnicas de Sanger incluía una evaluación de 16 genes[59] y, sin embargo, en la actualidad se han descrito más de 60 genes relacionados con MCD, cada uno responsable de una pequeña cantidad de casos[46, 47, 61]. Esta gran variabilidad de genes causales diferencia a la MCD de otras miocardiopatías, como la miocardiopatía hipertrófica, en la que unos pocos genes causan la gran mayoría de casos[62], y ha dificultado el estudio de los mecanismos causales y el screening genético en la MCD familiar.

En la actualidad, la irrupción de las nuevas técnicas de secuenciación ha revolucionado el estudio de las enfermedades genéticas en general, y de la miocardiopatía dilatada en particular. Estas técnicas permiten la evaluación de un gran número de genes al mismo tiempo, y la creación de multitud de datos genómicos que pueden ser recogidos en bases y analizados con rapidez y eficacia. La otra gran cualidad de las nuevas técnicas de secuenciación es el bajo coste en relación con el estudio genético empleando la técnica de Sanger, con el consiguiente incremento en la realización de estudios genéticos a pacientes y familiares en la práctica clínica diaria[63, 64].

En las Tablas 3 y 4 se muestran 59 genes que se han relacionado con MCD, clasificados como causa mayor o menor según la frecuencia estimada de mutaciones en ellos encontradas en los

estudios publicadas hasta la fecha. Estos genes pertenecen a alguna de las estructuras que constituyen la célula cardíaca, como podemos ver en la Figura 3.

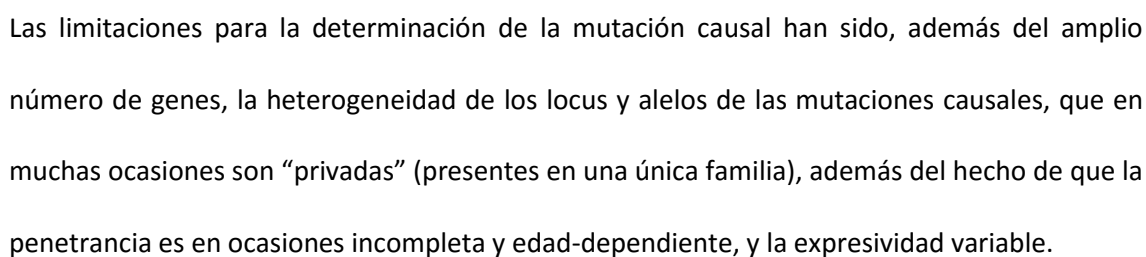
Tabla 3: Causas genéticas MAYORES de MCD

Gen	Proteína	Función	OMIM	Porcentaje de MCD estimado (%)	Otros fenotipos	Patrón hereditario
TTN	Titina	Estructura sarcomérica / soporte para otras proteínas	188840	15-25	Miopatía, MCH	AD
LMNA	Lamina A/C	Estructura / estabilidad de la membrana interna nuclear; expresión génica	150330	4-8	Lipodistrofia, Charcot-Marie-Tooth, Distrofia de Emery-Dreifuss, Distrofia de caderas 1B	AD
MYH7	Cadena pesada β -miosina	Proteína sarcomérica, contracción muscular	160760	4-6	MCH, miopatía	AD
TNNT2	Troponina T	Proteína sarcomérica, contracción muscular	191045	3-6	MCH	AD
RBM20	Proteína ligadora de RNA 20	Proteína ligadora de RNA del spliceosoma	613171	3-6		AD
BAG3	BCL2-asociada athanogene 3	Co-chaperona de las proteínas del shock por calor	603883	2-4	Miopatía	AD
TPM1	Tropomiosina	Proteína sarcomérica, contracción muscular	191010	2-4	MCH	AD
DSP	Desmoplaquina	Proteína desmosómica, unión celular	125660	1-3	MCA, Sd. Carvajal	AD y AR
SCN5A	Canal del sodio	Controla el flujo de sodio	600163	1-2	Sd. Brugada, QT largo, FV idiopática, Enf. nodo sinusal	AD
ACTC1	Actina	Proteína sarcomérica, contracción muscular	102540	1-2	MCH	AD
MYBPC3	Proteína C ligadora de la miosina	Proteína sarcomérica, contracción muscular	600958	1	MCH	AD

DMD	Distrofina	Complejo glicoproteínico asociado a la distrofina, traduce la fuerza contráctil	300377	<1	Distrofias de Duchenne y Becker	Ligado a X
TAZ	Tafazina	Metabolismo de la cardiolipina	300394	<1	Sd. de Barth, MCH, MCNC, fibroelastosis endocárdica	Ligado a X
PLN	Fosfolamban	Regulador de calcio del retículo sarcoplásmico, inhibe la bomba SERCA2	172405	<1	MCH	AD
PKP2	Placofilina	Proteína desmosómica, une cadherinas a citoesqueleto	602861	<1	MCA, Sd. de la piel frágil	AD
DES	Desmina	Complejo glicoproteínico asociado a la distrofina, traduce la fuerza contráctil	125660	<1	MCR, MCH, MCA, miopatía miofibrilar	AD y AR
DSG2	Desmogleína	Proteína desmosómica transmembrana, une calcio	125671	<1	MCA, pénfigo autoinmune	AD
LDB3	Dominio de unión a LIM	Ensamblaje del citoesqueleto; agrupación de proteínas de membrana	605906	<1	MCH, miopatía miofibrilar	AD
TNNI3	Troponina I	Proteína sarcomérica, contracción muscular	191044	<1	MCH, MCR	AD y AR
TNNC1	Troponina C	Proteína sarcomérica, contracción muscular	191040	<1	MCH	AD

Tabla 4: Causas genéticas menores de MCD

Gen	Proteína	OMIM
ABCC9	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 9	601439
ACTN2	Actinin, alpha 2	102573
ADRB1	Adrenoceptor beta 1	109630
ADRB2	Adrenoceptor beta 2, surface	109690
ANKRD1	Ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle)	609599
BRAF	B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase	164757
CRYAB	Crystallin, alpha B	123590
CSRP3	Cysteine and glycine-rich protein 3 (cardiac LIM protein)	600824
CTF1	Cardiotrophin 1	600435
DSC2	Desmocollin 2	125645
DTNA	Dystrobrevin, alpha	601239
EMD	Emerin	300384
EYA4	EYA transcriptional coactivator and phosphatase 4	603550
FHL1	Four and a half LIM domains 1	300163
FHL2	Four and a half LIM domains 2	602633
FKTN	Fukutin	607440
FLNC	Filamin C, gamma	102565
GAA	Glucosidase, alpha; acid	606800
JUP	Junction plakoglobin	173325
KCNJ2	Potassium channel, inwardly rectifying subfamily J, member 2	600681
KCNQ1	Potassium channel, voltage gated KQT-like subfamily Q, member 1	607542
LAMA4	Laminin, alpha 4	600133
LAMP2	Lysosomal-associated membrane protein 2	309060
MYH6	Myosin, heavy chain 6, cardiac muscle, alpha	160710
MYL2	Myosin, light chain 2, regulatory, cardiac, slow	160781
MYL3	Myosin, light chain 3, alkali; ventricular, skeletal, slow	160790
MYOT	Myotilin	604103
MYPN	Myopalladin	608517
NEXN	Nexilin (F actin binding protein)	613121
PDLIM3	PDZ and LIM domain 3	605889
PLEC	Plectin	601282
PSEN1	Presenilin 1	104311
PSEN2	Presenilin 2	600759
SGCD	Sarcoglycan, delta (35kDa dystrophin-associated glycoprotein)	601411
TBX20	T-box 20	606061
TCAP	Titin-cap	604488
TMEM43	Transmembrane protein 43	612048
TMPO	Thymopoietin	188380
VCL	Vinculin	193065



Uno de los primeros estudios en el campo de la MCD que empleó las nuevas técnicas de secuenciación examinó la relación entre el desarrollo de MCD y mutaciones que provocan truncamientos en la proteína más grande del organismo, la titina, codificada por un gen con 281 kb y 363 exones[45]. El gran tamaño de este gen había dificultado su estudio por medio de las técnicas antiguas. En el año 2012, Herman et al. publicaron en el NEJM un trabajo en el que se evaluaron mutaciones en este gen en 312 sujetos con MCD, 213 pacientes con

miocardiopatía hipertrófica y 249 controles, descubriendo que el 25% de los casos de MCD familiar de su cohorte, y el 18% de los casos de MCD esporádica, presentaban mutaciones que provocaban truncamientos de esta proteína. Este hallazgo se ha reproducido posteriormente en otros estudios, motivo por el que la titina se considera actualmente el gen más frecuentemente mutado en la MCD.

La MCD se ha considerado clásicamente y en términos generales una enfermedad monogénica con un patrón de herencia autosómica dominante, en la cual un único defecto genético por sí mismo es capaz de causar la enfermedad, aunque otros moduladores ambientales, además de la edad y el sexo, influyen en su expresividad[41]. Los estudios familiares llevados a cabo en las últimas décadas han identificado otros patrones de herencia en relación con esta entidad: autosómico recesivo, ligado a X y mitocondrial[41, 46]. Un estudio realizado en 1999 en Italia evaluó 350 pacientes con MCD, y 281 familiares de 60 de las familias. Los patrones de herencia que identificaron fueron los siguientes:

- Autosómico dominante sin afectación muscular (56%).
- Autosómico recesivo, con inicio a edad más precoz y rápida progresión (16%).
- Ligado a X, en varones con rápida progresión a insuficiencia cardiaca, en relación a mutaciones en el gen de la distrofina (10%).
- Autosómico dominante asociado a afectación muscular (7,7%).
- Asociado a defectos de conducción (2,6%).
- Inclasificable (7,7%).

Las manifestaciones de la MCD hereditaria son similares a las de la MCD esporádica. Sin embargo, hay datos en el perfil familiar y en la historia del paciente que pueden orientar hacia un origen genético, como las alteraciones en el sistema de conducción, la afectación muscular y los niveles de creatin kinasa (CK) elevados. Estas “pistas” no deben sin embargo considerarse

que aparezcan de forma invariable, ya que en ocasiones el perfil clínico de familias con la misma mutación puede variar de forma notable [65].

La interpretación de los estudios genéticos es asimismo delicada, y debe ser manejada con precaución, y dejarse en manos de profesionales expertos en la evaluación de resultados genéticos. El problema fundamental que han acarreado las nuevas técnicas de secuenciación es la identificación de variantes no claramente patogénicas, las llamadas variantes de significado incierto (VSI), que hay que evaluar con precaución para discernir si constituyen variantes de la normalidad o si por el contrario pueden ser alteraciones causales de MCD. Los diversos criterios que se han utilizado para considerar una variante como patogénica incluyen la ausencia de la variante en una amplia cohorte de individuos de la misma raza, la afectación de un residuo aminoácido altamente conservado en la evolución, y la afectación funcional de la proteína, evaluada mediante programas bioinformáticos (modelos in-silico) o bien por modelos animales. Sin embargo, el criterio que más pesa en determinar la patogenicidad de una variante es la cosegregación familiar de la mutación con la enfermedad[41, 47, 56, 58]. Por tanto, a pesar de las premisas mencionadas, la cosegregación del defecto genético con la enfermedad en múltiples miembros de una familia se considera la prueba más esclarecedora para clasificar una variante como mutación causal.

En los últimos años, no sólo se ha propulsado el estudio de los genes causantes de MCD, sino que, cada vez con más frecuencia, se han realizado estudios dirigidos a establecer correlaciones fenotipo-genotipo, con idea de optimizar el tratamiento en estos pacientes, establecer un diagnóstico precoz y determinar el pronóstico y el riesgo de muerte súbita, lo que ayudaría a la toma de decisiones como el implante de desfibrilador.

Sin embargo, distintas mutaciones en el mismo gen pueden dar lugar a fenotipos completamente dispares, incluso al desarrollo de diferentes tipos de miocardiopatías. Es más,

incluso la misma mutación, dentro de una misma familia, puede causar una afectación completamente diferente entre unos y otros individuos, sin conocerse por el momento los mecanismos que provocan su desarrollo en unos y no en otros.

El hecho de que muchas mutaciones sean privadas dificulta la extracción de conclusiones sobre las distintas variantes obtenidas, al existir un escaso número de individuos afectados, pero las grandes bases de datos de que disponemos en la actualidad (ClinVar, ARVC database, LMNA database...) permiten agrupar datos de numerosos pacientes y facilitarán en el futuro el conocimiento de las características fenotípicas asociadas a mutaciones concretas.

1.6 – Next Generation Sequencing

En los últimos años se han producido grandes avances en el campo de la genómica, con la aparición de las nuevas técnicas de ultrasecuenciación del ADN, con lo que los estudios genéticos han mejorado dramáticamente, hasta el punto de que hoy en día la secuenciación del genoma completo de un individuo se ha convertido en práctica frecuente. La denominada Next Generation Sequencing (o secuenciación de siguiente generación, NGS) es un tipo de tecnología de secuenciación de ADN que utiliza la secuenciación paralela de múltiples fragmentos pequeños de ADN para determinar la secuencia genética[66, 67]. Esta tecnología de "alto rendimiento" ha permitido un aumento abismal en la velocidad, y una gran disminución en el coste del análisis de grandes segmentos de ADN. Las técnicas de NGS permiten el análisis simultáneo de un gran número de genes con rapidez, y la creación de multitud de datos genómicos que pueden ser analizados en cortos períodos de tiempo.

En lo que respecta a las enfermedades cardíacas hereditarias, la identificación de múltiples causas genéticas de estas enfermedades abrió una nueva ventana para el diagnóstico precoz, la comprensión de su historia natural y la mejora en la estratificación del riesgo y el manejo. Sin embargo, la aplicación clínica de la genética había estado limitado por el coste prohibitivo y el escaso rendimiento de las tecnologías de genotipado disponibles, fundamentalmente la secuenciación Sanger, que evaluaba los exones y genes uno a uno, con el tiempo y el coste que esto requería. La aparición de las técnicas NGS han cambiado por completo este escenario, puesto que esta tecnología permite la evaluación de cientos o incluso miles de genes en paralelo de forma asequible. Ahora el desafío no está en el genotipado en sí, sino en la interpretación de la multitud de resultados que se generan y la detección de múltiples variantes de significado incierto.

En cualquier caso, la aparición de NGS ha aumentado sensiblemente el rendimiento del estudio genético en la MCD, tanto idiopática como familiar[47].

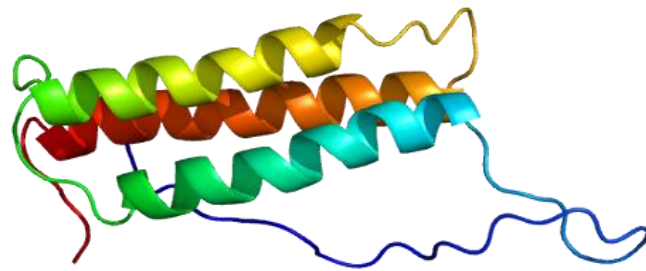
1.7 – BAG3

Uno de los genes que recientemente se ha relacionado con MCD, y ha cobrando interés en los últimos años, es BAG3[68, 69]. El gen BAG3 (BLC2 asociada athanogene 3) codifica para una proteína que pertenece a una familia de cochaperonas con un papel antiapoptótico relacionado con la vía del shock térmico (HSP/HSP70: una familia de proteínas altamente conservadas en la evolución, liberadas por la célula en respuesta al estrés, a fin de estimular la reparación y la degradación de agregados proteicos que aparecen bajo situaciones estresantes tales como aumento de la temperatura, condiciones de sobrecarga, etc).

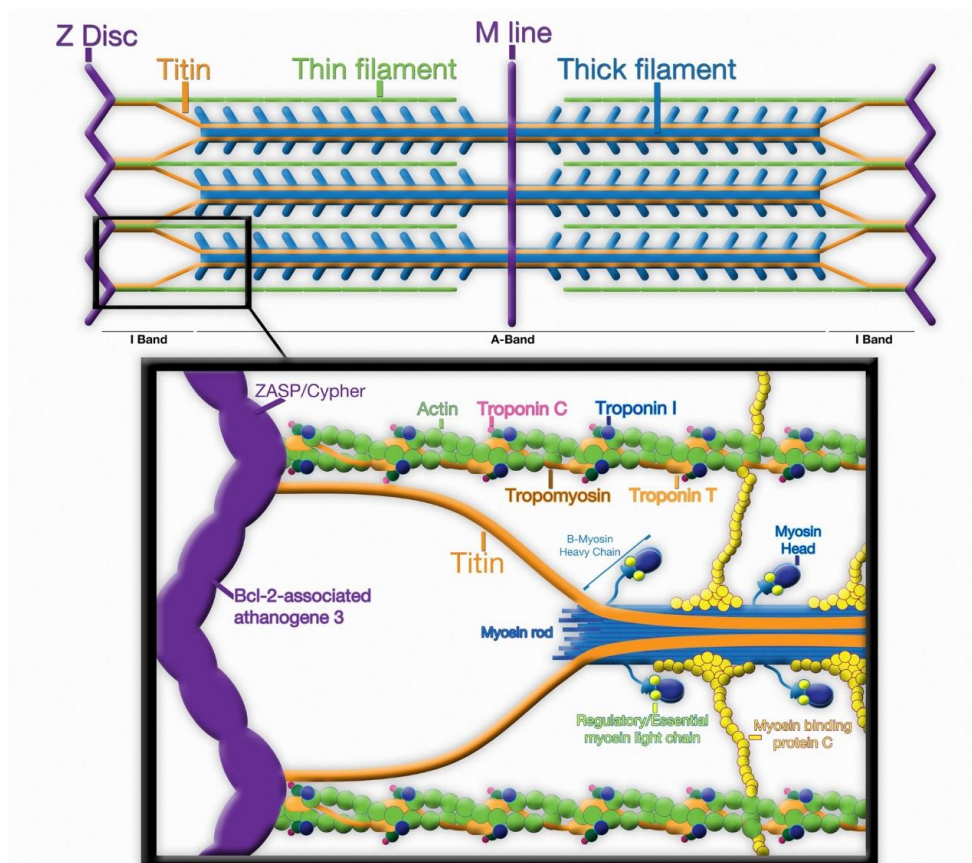
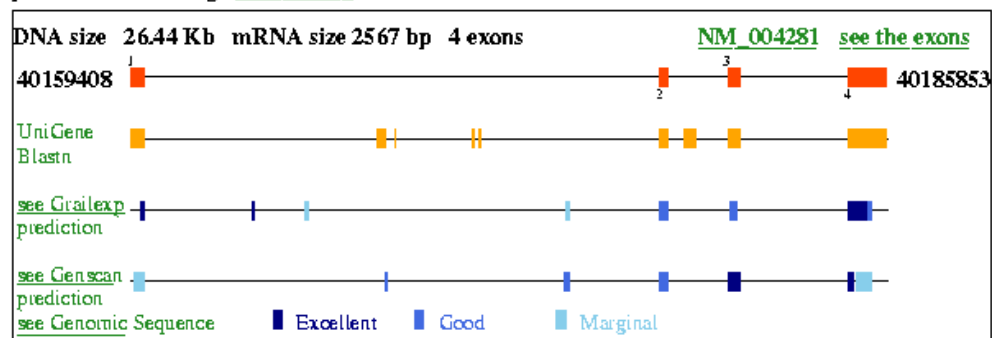
BAG3 se compone de 4 exones, y se expresa principalmente en células del músculo esquelético y en los miocardiocitos, donde se localiza en los discos Z del sarcómero (Figura 4). Aunque no está establecida por completo su función a nivel cardíaco, se postula que en ese lugar cumple probablemente una función de señalización[70].

Las mutaciones en este gen se habían relacionado en el pasado con miopatía miofibrilar, con un curso clínico de predominio axial y de progresión rápida, y de inicio en las dos primeras décadas de la vida[71-73]. La primera relación de este gen con patología cardíaca surgió a raíz de estudios con ratones knock-out, que demostraron que la ausencia de actividad de esta proteína causaba degeneración de fibras del músculo estriado, con núcleos apoptóticos, y abocaba a una miopatía esquelética fulminante junto con miocardiopatía[70]. Posteriormente, otros estudios experimentales con pez-cebra con anulación de BAG3 mostraron desarrollo de cambios en el miocardio similares a los que ocurren en la MCD humana[69]. Puesto que BAG3 tiene una función antiapoptótica, las mutaciones en este gen podrían conducir a un aumento de la sensibilidad a la apoptosis en situaciones de estrés metabólico o mecánico, como se ha demostrado en estudios experimentales[74, 75]. La primera descripción de este gen en relación con MCD humana fue publicada en 2011[68]. Desde entonces, se han descrito mutaciones nuevas en algunos estudios[76, 77], pero el pequeño número de pacientes y la heterogeneidad de las variantes han obstaculizado la realización de estudios de genotipo-fenotipo sólidos.

Figura 4: Gen BAG3 y su localización en la célula cardiaca. (Tomadas de PyMOL web, GENATLAS web y de García-Pavía et al⁶¹).



present in the contig : [NT_030059](#) of Genbank



1.8 – Emerina

El gen de la Emerina (EMD) es un gen compuesto de 6 exones y localizado en el cromosoma X. Codifica para una proteína de la membrana nuclear, que interacciona entre otras con la Lamina, y tiene una función de anclaje al citoesqueleto[78] (Figura 5).

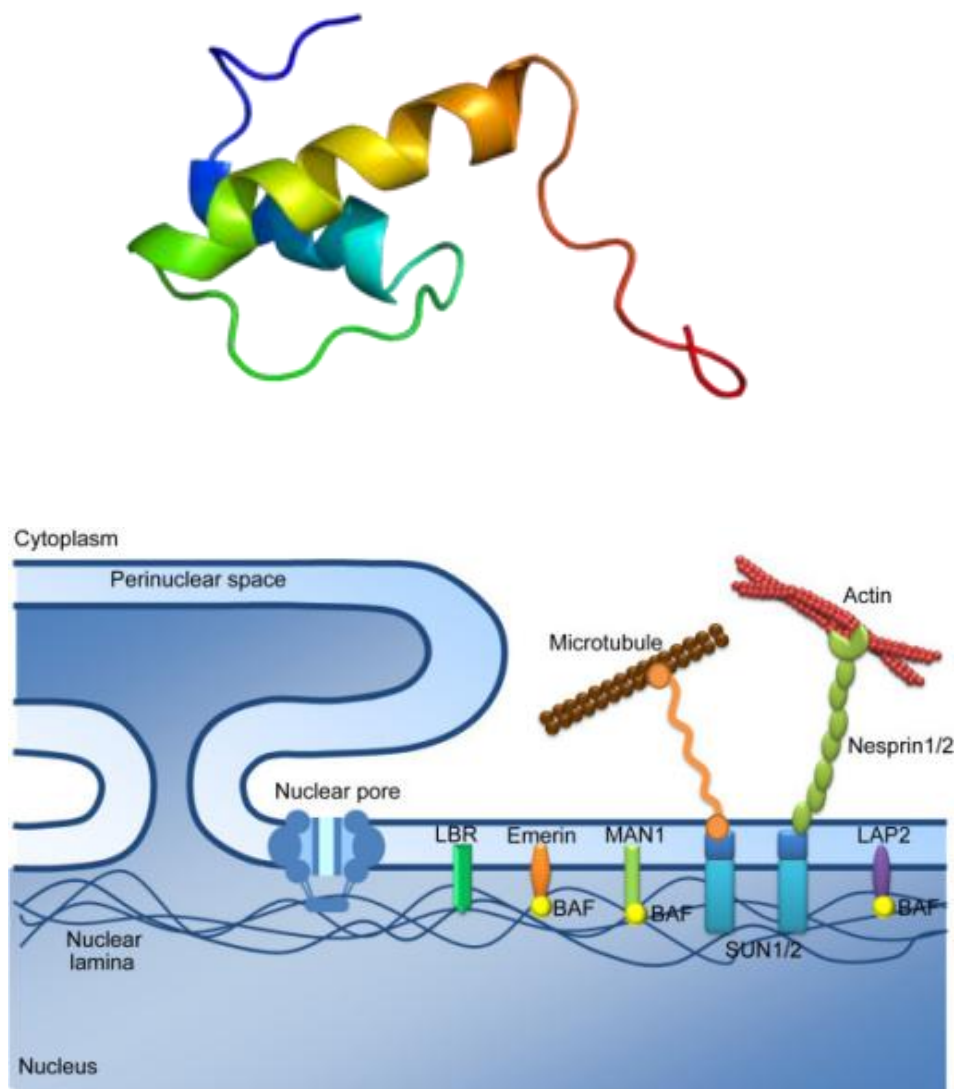
Se han relacionado mutaciones en este gen con la distrofia muscular de Emery-Dreifuss, o distrofia muscular humeroperoneal: una miopatía degenerativa ligada a X con debilidad y desgaste muscular de distribución humeroperoneal y progresión lenta, de inicio en la primera o segunda década de la vida[79, 80]. Esta enfermedad también se ha asociado con mutaciones en el gen de la Lamina, con distinto patrón de herencia (autosómico dominante en este caso) pero curso clínico similar, lo que señala la íntima unión en que interaccionan estas dos proteínas[81].

Una parte de los pacientes con distrofia muscular de Emery-Dreifuss desarrollan miocardiopatía dilatada, con características que recuerdan a las laminopatías: se asocia a alteraciones de la conducción auriculoventricular, con bloqueos auriculoventriculares, pero también con bradicardia sinusal o parálisis auricular y taquicardias supraventriculares como fibrilación y flutter auricular, que pueden ser los primeros signos de afectación cardíaca[82]. Estos pacientes pueden presentar síncope o presíncope, que suelen ser consecuencia de bloqueos atrioventriculares infranodales o ritmos de la unión lentos, lo que requiere la implantación de marcapasos[83]. La aparición de anomalías cardíacas ocurre por lo general en la tercera década de la vida, aunque se han objetivado casos más precoces. También se asocia a muerte súbita, que puede ocurrir en pacientes no diagnosticados previamente al presentar escasa miopatía esquelética. No existe una correlación entre el grado de afectación neuromuscular y la gravedad de las manifestaciones cardíacas. El desarrollo de miocardiopatía arritmogénica, insuficiencia cardíaca y taquicardias ventriculares y muerte súbita son más comunes y más graves en la distrofia de Emery-Dreifuss causada por mutaciones en la Lamina[84], pero también se ha objetivado en mutaciones en la Emerina[85].

La afectación cardíaca habitualmente condiciona el pronóstico en estos pacientes. Se debe evaluar la situación cardiovascular anualmente, y ante la presencia de afectación cardíaca, se contempla el implante de desfibrilador en prevención primaria[86, 87]. Puesto que la afectación muscular suele progresar de forma lenta, esta miopatía no contraindica el trasplante cardíaco si éste está indicado[88].

Al ser esta una enfermedad ligada al cromosoma X, la afectación difiere entre hombres y mujeres: éstas presentan con menos frecuencia afectación cardíaca, y cuando lo hacen, muy raramente se manifiesta como MCD franca[89]. Hay muy pocos casos descritos de MCD por mutaciones en este gen en mujeres, tan sólo casos aislados con trastornos de conducción[90].

Figura 5: Gen EMD y su localización en la célula cardiaca. Tomado de Protein Data Bank web y Chi YH et al⁷⁸.



2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

2.1 - OBJETIVO PRINCIPAL

- Realizar la caracterización clínica, genética y anatomopatológica de una cohorte de pacientes trasplantados a consecuencia de una MCD familiar, utilizando las nuevas técnicas de ultrasecuenciación, y valorar tanto el componente genético de esta entidad como la utilidad de las nuevas tecnologías en este contexto.

2.2 - OBJETIVOS CONCRETOS

1. - Determinar la prevalencia de mutaciones en genes asociados a MCD en una cohorte de pacientes trasplantados por MCD familiar.

2. Evaluar la capacidad de las nuevas técnicas de ultrasecuenciación combinadas con el estudio familiar para documentar las mutaciones causales en pacientes trasplantados cardiacos por MCD familiar.

3. - Estudiar las características fenotípicas de los pacientes con MCD familiar que requieren trasplante, con intención de establecer correlaciones fenotipo-genotipo.

4. - Analizar y determinar si existen características clínicas y anatomopatológicas especiales en pacientes con MCD familiar que presentan mutación causal de la enfermedad, y en aquellos que presentan dobles mutaciones.

5. - Evaluar mediante análisis anatomopatológico convencional (tinciones convencionales y microscopía óptica) y avanzado (inmunofluorescencia y microscopía confocal) las características histológicas de la MCD secundaria a mutaciones en genes de especial interés.

3. HIPÓTESIS DEL ESTUDIO

3.1 – HIPÓTESIS CONCEPTUALES:

- Los pacientes sometidos a TxC por padecer una MCD familiar presentan un origen genético de la enfermedad, que no puede ser estudiado mediante las técnicas convencionales de estudio genético.
- Las nuevas técnicas de secuenciación combinadas con la evaluación familiar permiten determinar el defecto genético causal en pacientes que padecen esta patología.

3.2 – HIPÓTESIS OPERATIVAS:

- El estudio de una cohorte amplia de TxC por MCD familiar empleando técnicas modernas de ultrasecuenciación permitirá conocer el espectro genético de esta enfermedad.
- El estudio clínico exhaustivo de los pacientes y sus familiares, unido al análisis de parámetros fisicoquímicos y filogenéticos de las variantes genéticas encontradas, permitirá confirmar o descartar la patogenicidad de las mutaciones halladas.
- Las características clínicas de los pacientes receptores de un trasplante por MCD familiar pueden relacionarse con diferentes defectos genéticos.
- El estudio anatomopatológico mediante técnicas convencionales y avanzadas permitirá establecer correlaciones genotipo-histología.

4. PACIENTES Y MÉTODOS

4.1 - Pacientes a estudio:

Se incluyeron un total de 52 pacientes no relacionados entre sí, trasplantados cardíacos debido a MCD familiar en 3 centros de trasplante cardíaco en España (Hospital Universitario Puerta de Hierro, Hospital Universitario 12 de Octubre, ambos en Madrid, y el Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, en Murcia).

Se definió la MCD familiar según los criterios publicados anteriormente[16], que exigen la existencia de uno o más familiares (además del paciente índice) con MCD demostrada en vida o en el examen post mortem, o que hubieran presentado muerte súbita cardíaca de etiología no explicada antes de los 35 años[16].

Sólo se incluyeron aquellos pacientes que cumplieran con los criterios clínicos para MCD del grupo de trabajo de la Organización Mundial de la Salud y la Sociedad Internacional y Federación Mundial de Cardiología[3] en el momento de trasplante (es decir, un diámetro telediastólico del ventrículo izquierdo (DTDVI) >27 mm/m² y una fracción de eyección $<40\%$ o fracción de acortamiento (FS) $<25\%$, en ausencia de condiciones hemodinámicas anormales, enfermedad coronaria, cardiopatías congénitas y otras enfermedades sistémicas). Se excluyeron los pacientes con enfermedad arterial coronaria significativa o miocarditis en el examen anatomopatológico del corazón explantado.

La evaluación pretrasplante estaba compuesta por examen físico, electrocardiograma (ECG) de 12 derivaciones, ecocardiograma, holter de 24 horas, test de la marcha de 6 minutos, prueba de esfuerzo y cateterismo cardíaco derecho. Estudios adicionales, como biopsia endomiocárdica, estudio electrofisiológico o resonancia magnética, se realizaron únicamente ante indicación clínica específica a juicio de los médicos habituales del paciente.

Un médico de cada centro participante, sin conocer los resultados del estudio genético, revisó los historiales de los pacientes de forma retrospectiva. Se recogieron los datos clínicos y los

resultados de las pruebas en la primera evaluación realizada por el equipo de trasplante en cada centro.

Este estudio fue aprobado por el comité ético de los centros participantes, y cumple con la Declaración de Helsinki.

4.2 - Evaluación genética

El ADN se obtuvo a partir de muestras de sangre extraídas a los probandos y almacenadas a -70°C. Las muestras de ADN fueron analizadas por NGS, con un panel de 126 genes relacionados con enfermedades cardiovasculares hereditarias, 59 de ellos asociados específicamente con MCD (Tabla 5), incluyendo tanto los exones como las regiones intrónicas flanqueantes. El enriquecimiento dirigido de las muestras se realizó con SureSelect (Agilent) y el diseño de las sondas se llevó a cabo usando eArray (Agilent). La secuenciación se llevó a cabo en una Illumina HiSeq 1500. El análisis bioinformático se realizó con un sistema previamente validado. La cobertura media fue de 456 repeticiones; más del 99% de los fragmentos tenían una cobertura mayor de 15 repeticiones y más del 98% tenían una cobertura mayor de 30 repeticiones. Se realizó secuenciación por Sanger para evaluar todas las regiones con baja cobertura (<15 repeticiones) y para confirmar las variantes genéticas encontradas.

Las variantes genéticas detectadas se comprobaban en una búsqueda bibliográfica y en bases de datos internacionales, como ClinVar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) y The Human Gene Mutation Database (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>).

Tabla 5: Genes analizados en el estudio. Los genes en **negrita** corresponden a genes relacionados con MCD anteriormente.

Genes analizados	
ABCC9	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 9
ACTC1	Actin, alpha cardiac muscle 1
ACTN2	Actinin, alpha 2
ADRB1	Adrenoceptor beta 1
ADRB2	Adrenoceptor beta 2, surface
ADRB3	Adrenoceptor beta 3
AGL	Amylo-alpha-1, 6-glucosidase, 4-alpha-glucanotransferase
AKAP9	A kinase (PRKA) anchor protein 9
ANK2	Ankyrin 2, neuronal
ANKRD1	Ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle)
BAG3	BCL2-associated athanogene 3
BMPR2	Bone morphogenetic protein receptor, type II (serine/threonine kinase)
BRAF	B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase
CACNA1B	Calcium channel, voltage-dependent, N type, alpha 1B subunit
CACNA1C	Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit
CACNA1D	Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1D subunit
CACNA2D1	Calcium channel, voltage-dependent, alpha2/delta subunit 1
CACNB2	Calcium channel, voltage-dependent, beta 2 subunit
CALR3	Calreticulin 3
CASQ2	Calsequestrin 2 (cardiac muscle)
CAV3	Caveolin 3
CRYAB	Crystallin, alpha B
CSRP3	Cysteine and glycine-rich protein 3 (cardiac LIM protein)
CTF1	Cardiotrophin 1
DES	Desmin
DMD	Dystrophin
DSC2	Desmocollin 2
DSG2	Desmoglein 2
DSP	Desmoplakin
DTNA	Dystrobrevin, alpha
ELN	Elastin
EMD	Emerin
EYA4	EYA transcriptional coactivator and phosphatase 4
FHL1	Four and a half LIM domains 1
FHL2	Four and a half LIM domains 2
FKTN	Fukutin
FLNC	Filamin C, gamma
FXN	Frataxin
GAA	Glucosidase, alpha; acid
GATA4	GATA binding protein 4
GJA1	Gap junction protein, alpha 1, 43kDa
GJA5	Gap junction protein, alpha 5, 40kDa
GLA	Galactosidase, alpha
GPD1L	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like
HCN1	Hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated potassium channel 1

HCN4	Hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated potassium channel 4
HRAS	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
JAG1	Jagged 1
JPH2	Junctophilin 2
JUP	Junction plakoglobin
KCNA5	Potassium channel, voltage gated, shaker related subfamily A, member 5
KCND3	Potassium channel, voltage gated, Shal related subfamily D, member 3
KCNE1	Potassium channel, voltage gated subfamily E regulatory beta subunit 1
KCNE1L/KCNE5	Potassium channel, voltage gated subfamily E regulatory beta subunit 5
KCNE2	Potassium channel, voltage gated subfamily E regulatory beta subunit 2
KCNE3	Potassium channel, voltage gated subfamily E regulatory beta subunit 3
KCNE4	Potassium channel, voltage gated subfamily E regulatory beta subunit 4
KCNH2	Potassium channel, voltage gated eag related subfamily H, member 2
KCNJ11	Potassium channel, inwardly rectifying subfamily J, member 11
KCNJ12	Potassium channel, inwardly rectifying subfamily J, member 12
KCNJ2	Potassium channel, inwardly rectifying subfamily J, member 2
KCNJ3	Potassium channel, inwardly rectifying subfamily J, member 3
KCNJ5	Potassium channel, inwardly rectifying subfamily J, member 5
KCNJ8	Potassium channel, inwardly rectifying subfamily J, member 8
KCNQ1	Potassium channel, voltage gated KQT-like subfamily Q, member 1
KCNQ2	Potassium channel, voltage gated KQT-like subfamily Q, member 2
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LAMA4	Laminin, alpha 4
LAMP2	Lysosomal-associated membrane protein 2
LDB3	LIM domain binding 3
LMNA	Lamin A/C
LRP6	Low density lipoprotein receptor-related protein 6
MAP2K1	Mitogen-activated protein kinase kinase 1
MAP2K2	Mitogen-activated protein kinase kinase 2
MYBPC3	Myosin binding protein C, cardiac
MYH6	Myosin, heavy chain 6, cardiac muscle, alpha
MYH7	Myosin, heavy chain 7, cardiac muscle, beta
MYL2	Myosin, light chain 2, regulatory, cardiac, slow
MYL3	Myosin, light chain 3, alkali; ventricular, skeletal, slow
MYLK2	Myosin light chain kinase 2
MYOT	Myotilin
MYOZ2	Myozenin 2
MYPN	Myopalladin
NEXN	Nexilin (F actin binding protein)
NKX2-5	NK2 homeobox 5
NPPA	Natriuretic peptide A
NRAS	Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
PDLIM3	PDZ and LIM domain 3
PKP2	Plakophilin 2
PKP4	Plakophilin 4
PLEC	Plectin
PLN	Phospholamban
PNN	Pinin, desmosome associated protein
PRKAG2	Protein kinase, AMP-activated, gamma 2 non-catalytic subunit
PSEN1	Presenilin 1

PSEN2	Presenilin 2
PTPN11	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11
RAF1	Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase
RANGRF	RAN guanine nucleotide release factor
RBM20	RNA binding motif protein 20
RYR2	Ryanodine receptor 2 (cardiac)
SCN1B	Sodium channel, voltage gated, type I beta subunit
SCN2B	Sodium channel, voltage gated, type II beta subunit
SCN3B	Sodium channel, voltage gated, type III beta subunit
SCN4B	Sodium channel, voltage gated, type IV beta subunit
SCN5A	Sodium channel, voltage gated, type V alpha subunit
SCNN1B	Sodium channel, non voltage gated 1 beta subunit
SCNN1G	Sodium channel, non voltage gated 1 gamma subunit
SGCD	Sarcoglycan, delta (35kDa dystrophin-associated glycoprotein)
SHOC2	Soc-2 suppressor of clear homolog (C. elegans)
SLC25A4	Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 4
SNTA1	Syntrophin, alpha 1
SOS1	Son of sevenless homolog 1 (Drosophila)
TAZ	Tafazzin
TBX20	T-box 20
TCAP	Titin-cap
TGFB3	Transforming growth factor, beta 3
TMEM43	Transmembrane protein 43
TMPO	Thymopoietin
TNNC1	Troponin C type 1 (slow)
TNNI3	Troponin I type 3 (cardiac)
TNNT2	Troponin T type 2 (cardiac)
TPM1	Tropomyosin 1 (alpha)
TTN	Titin
TTR	Transthyretin
VCL	Vinculin

Clasificación de las variantes:

Las variantes se clasificaron inicialmente como **mutaciones patogénicas (MP)** o **variantes de significado incierto (VSI)**.

Se consideraron **MP** si cumplían una de las dos premisas siguientes:

- Si se localizaban en un gen asociado a MCD, no aparecían en controles y se habían descrito como patogénicas en la literatura o en bases de datos internacionales.
- Si se trataba de nuevas variantes en un gen asociado previamente a MCD, no encontradas en controles y producían un cambio que predecía un truncamiento prematuro, desplazamiento del marco de lectura o un splicing anormal de la proteína.

Por el contrario, las variantes se clasificaron como **VSI** si:

- Eran nuevas variantes missense en un gen asociado previamente a MCD y no encontradas en controles.
- Eran variantes descritas anteriormente como patogénicas en bases de datos internacionales, pero habían sido asimismo encontradas en controles.

En el análisis se encontraron otras variantes genéticas relevantes en genes no relacionados con MCD, que fueron notificadas pero excluidas del estudio.

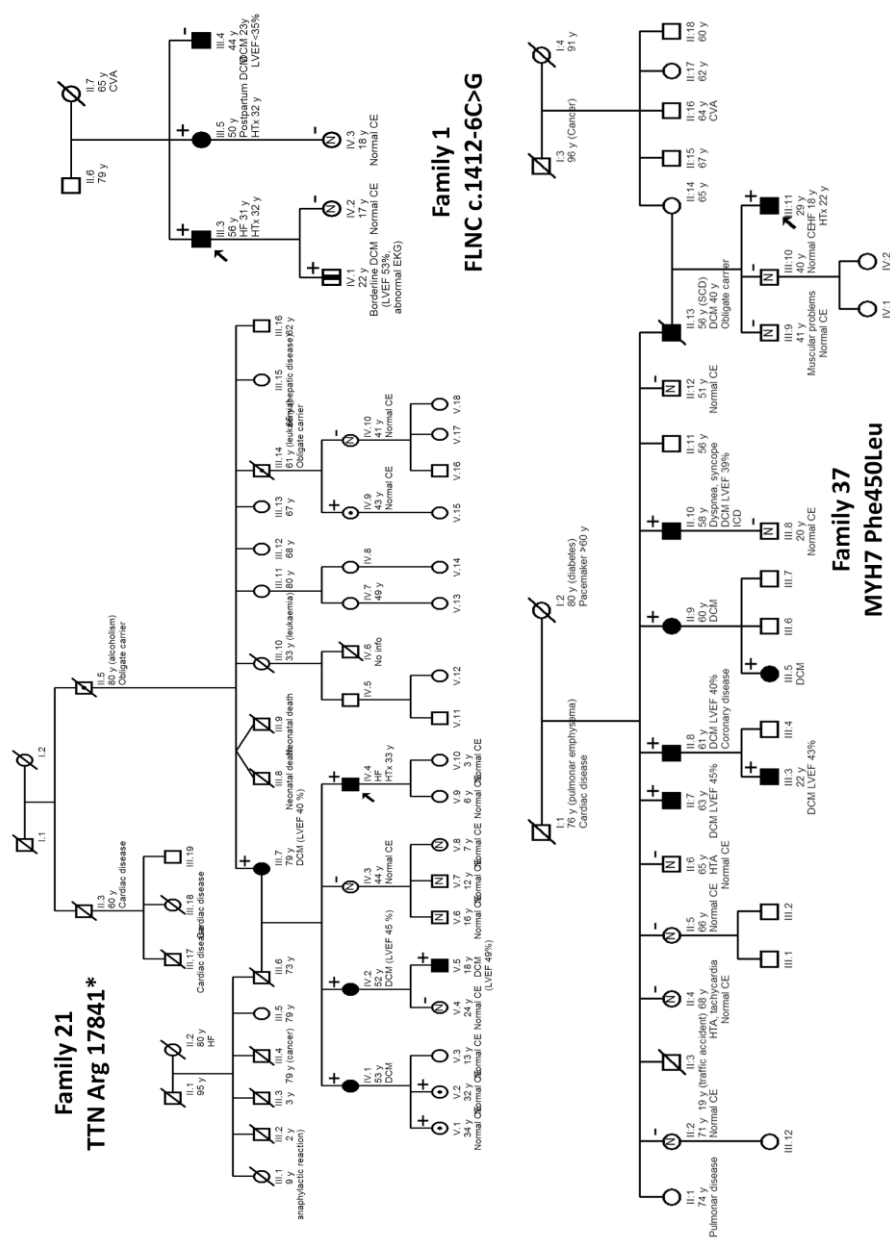
Posteriormente se llevaron a cabo **estudios familiares y de cosegregación**, y las VSI fueron reclasificados según los resultados de esta evaluación (Figura 6):

- Si la VSI cosegregaba con la MCD en la evaluación familiar, fueron reclasificadas como MP.
- Si no cosegregaban, se consideraron variantes no patógenas.
- Si la evaluación no fue concluyente, o si las variantes cosegregaban junto con otra VSI, no fueron reclasificadas y se mantuvieron como VSI.

Figura 6: Ejemplos de cosegregación, árboles genealógicos de 3 familias seleccionadas.

En la familia 21 la variante genética fue clasificada inicialmente como MP. La evaluación de la familia confirmó su patogenicidad. En la familia 1 la variante genética se clasificó inicialmente como una VSI. La evaluación de la familia mostró cosegregación negativa, y la variante fue reclasificada como no patológica. En la familia 37 la variante genética se clasificó inicialmente como una VSI. La evaluación de la familia mostró cosegregación y la variante fue reclasificada como patológica.

Los cuadrados y círculos indican familiares masculinos y femeninos, respectivamente. Los símbolos con una barra diagonal son fallecidos. Las flechas indican los probandos. Los símbolos sólidos indican individuos afectados. Los símbolos que contiene un punto son portadores no afectados. Los símbolos que contienen una "N" son los no portadores no afectados. Las edades indicadas se refieren a la edad en el momento de la muerte de los familiares fallecidos y la edad actual en los miembros vivos. HTx indica trasplante de corazón; y, años; CE, evaluación clínica (incluyendo electrocardiograma y ecocardiograma); SCD, muerte súbita cardíaca; ICD, desfibrilador automático implantable; HF, insuficiencia cardíaca; IAM, infarto agudo de miocardio; DCM, miocardiopatía dilatada; ACV, accidente cerebrovascular.



Las bases de datos genéticas utilizadas para determinar la presencia de las variantes en **controles** fueron dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) y la base de datos del NHLBI GO Exome Sequencing Project (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>).

El grado de **conservación** de los residuos de aminoácidos afectados por las variantes genéticas encontradas, se determinó utilizando Alamut (versión 2.4.5; Interactive Biosoftware, Rouen, Francia), por alineamiento múltiple de ortólogos en diversas especies (genes pertenecientes a especies biológicas distintas derivados de un gen ancestral común por un fenómeno de especiación). De forma predeterminada, los ortólogos alineados y mostrados en Alamut se tomaron de la base de datos Ensembl Compara. La conservación se graduó en muy alta, alta, media o baja, como se ha descrito en estudios anteriormente publicados[56].

4.3 - Evaluación familiar

A todos los familiares mayores de 16 años de edad de los pacientes con MP o VSI se les ofreció evaluación clínica y genética tras realizar consejo genético. La evaluación clínica incluyó anamnesis, exploración física, electrocardiograma y ecocardiograma. Todos los familiares firmaron consentimiento informado. El screening familiar se consideró positivo si uno o más parientes tenían MCD y presentaban el mismo defecto genético que el caso índice (Apéndice 1, árboles).

4.4 - Evaluación anatomopatológica

La evaluación anatomopatológica de los corazones explantados fue llevada a cabo por un anatomopatólogo experto en estudios cardiológicos, que desconocía tanto la clínica como la genética de los pacientes. Se tomaron muestras de la pared libre del ventrículo izquierdo, el ventrículo derecho y el tabique intraventricular para estudio histológico. Las muestras fueron

incluidas en parafina, se realizaron cortes de 6 micras de grosor y fueron teñidas según la práctica habitual con hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson.

Se evaluó la presencia de fibrosis, la sustitución miocitaria por tejido graso, la degeneración de miocitos y el infiltrado linfocitario intersticial. Para la cuantificación de la fibrosis, se diferenció el espesor medio que ocupaba este tejido de endocardio a epicardio, en tres categorías: < 25%, 25-75% y > 75%.

4.5 - BAG3: Microscopía confocal

En los pacientes con mutaciones en el gen BAG3, se analizaron las muestras por medio de microscopía confocal.

A diferencia de la microscopía fotónica clásica, en la que la imagen enfocada se ve contaminada por la superposición de los elementos del tejido que están tanto por encima como por debajo de la zona de enfoque, y únicamente puede minimizarse mediante la realización de cortes de tejido lo más finos posible, con la consecuencia de la pérdida de la arquitectura global del tejido, la microscopia confocal utiliza una técnica óptica de imagen que permite enfocar únicamente un plano determinado de la muestra, eliminando la luz (fluorescencia) procedente de las regiones que no están en el plano de enfoque, y permitiendo realizar cortes ópticos finos a muestras de tejidos más o menos gruesos y realizar reconstrucciones en tres dimensiones a partir de cortes seriados. Esto hace posible la obtención de imágenes de la arquitectura tridimensional de células y tejidos.

Las muestras de pacientes con mutaciones en BAG3 fueron evaluadas mediante esta técnica, con un marcaje fluorescente para la actinina (verde) y BAG3 (rojo), permitiendo visualizar la arquitectura sarcomérica y la localización de BAG3 en la célula.

4.6 - Análisis de haplotipos en los portadores de mutaciones Emerina c.77T>C

En 9 portadores de la mutación c.77T>C encontrada en el gen de la Emerina, se genotiparon tres marcadores microsatélite polimórficos y seis polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs). Los marcadores microsatélite polimórficos que flanquean el gen EMD se eligieron utilizando los mapas genéticos Marshfield (<http://research.marshfieldclinic.org/genetics/GeneticResearch/compMaps.asp>) y el explorador UCSC genoma (<http://genome.ucsc.edu/>). Los SNPs fueron seleccionados a partir de la base de datos NCBI SNP. Los 9 marcadores (2 anteriores y 7 posteriores a la mutación) se localizaban en una región de 2,87 Mb (3,35 cm) en el cromosoma X.

Los fragmentos de los marcadores polimórficos amplificados por PCR, se marcaron utilizando un oligonucleótido marcado con fluorescencia. El análisis de los fragmentos se realizó en un secuenciador automático ABI3730 utilizando el software GeneMapper 4.0. El tamaño de los alelos de los pacientes se tomó de la base de datos CEPH (<http://www.cephb.fr/>). La genotipificación de los SPNs se realizó mediante amplificación por PCR específicamente de la región de interés y secuenciación del ADN con Big Dye terminator 3.1 en un secuenciador automatizado AB3730.

4.7 - Análisis estadístico

Las variables continuas se expresan como media \pm desviación estándar. Las variables discretas se muestran como porcentajes. Los datos fueron analizados utilizando el software SPSS (versión 16.0).

5. RESULTADOS

5.1 – Características clínicas e histopatológicas de la MCD sometida a TxC

5.1.1 - Características clínicas

La cohorte del estudio incluyó 52 pacientes (edad media en la evaluación inicial $40,1 \pm 14,4$ años, rango de 11 a 64 años; 92% varones). Sus características clínicas y familiares se muestran en las Tablas 6 y 7.

Un total de 48 pacientes (92%) eran varones. La edad media al trasplante fue de $40,7 \pm 14,5$ años, rango de 11 a 64. La FEVI media de los pacientes en la primera evaluación fue de $21,3 \pm 6,5\%$. Su diámetro telediastólico medio fue de $69,4 \pm 11,2\%$, con un porcentaje del predicho según la fórmula de Henry del $147,18 \pm 19,2\%$. 30 pacientes (58%) tenían algún tipo de afectación del ventrículo derecho. Un total de 24 pacientes (46%) estaban en clase funcional NYHA III en la primera evaluación por el equipo de TxC. De los 52 sujetos, 20 (38%) estaban en NYHA IV, 6 (12%) en NYHA II y 2 pacientes (4%) en NYHA I. En 20 pacientes (38%) se habían documentado taquicardias ventriculares no sostenidas, 8 (15%) habían presentado arritmias ventriculares sostenidas y 4 (8%) muerte súbita recuperada. 13 pacientes (25%) tenían historia de fibrilación auricular paroxística o crónica, y 1 paciente (2%) de flutter auricular. El trasplante se realizó de forma electiva en 34 pacientes (65%) y urgente en 18 (35%). El tiempo medio de seguimiento desde la primera evaluación hasta el TxC fue de 237 ± 409 días, y el tiempo en lista de espera de 98 ± 196 días. Cincuenta y un pacientes (98%) tenían antecedentes familiares de MCD y 20 (38%) de muerte súbita (7 en un familiar menor de 35 años). El 100% de los pacientes cumplían criterios de MCD familiar. Los árboles genealógicos de las 52 familias se muestran en el Apéndice 1.

5.1.2 - Características histopatológicas

La evaluación histopatológica de los corazones explantados pudo realizarse en 30 de los pacientes incluidos en el estudio. Sus características se muestran en las Tablas 8 y 9.

Tabla 6: Características clínicas y familiares de los pacientes índice

Paciente	Sexo	Edad ECI/TxC	Variantes genéticas	NYHA	ECG	VI y VD	Arritmias	Ergometría	Curso clínico previo al Tx	Familia
1	M	31/32	FLNC - NM_001458.4:c.1412-6C>G	II	Ritmo sinusal. Ritmo ventricular estimulado.	DTDVI: 70 mm; DTDVlp: 150%; FEVI 10%	BAV completo. Flutter auricular.		IC crónica. Tx electivo. Días desde la ECI: 99. Días en LE: 99.	Hermana con MCD periparto, Tx a los 32 años. Hermano con MCD a los 23 años. Abuelo con MSC a los 38 años.
2	M	23/23	TTN - NM_003319.4:c.13000A>T	I	Ritmo sinusal. Ondas T negativas en V5-V6. HARI.	Dilatación y disfunción severa de VI.			IC aguda. Tx urgente. Días desde la ECI: 7. Días en LE: 5.	Padre con MCD y Tx. Abuelo con MSC a los 50 años.
3	M	21/23	MYPN - NM_032578.3:c.59A>G PSEN2 - NM_000447.2:c.-21+5G>C	I	Ritmo sinusal. QRS: 120 ms. BRIHH.	DTDVI: 74 mm; DTDVlp: 152%; FEVI 30%. FEVD 20%.		7.9 METS. No arritmias.	IC crónica. Tx electivo. Días desde la ECI: 622. Días en LE: 13.	Tío con MCD, fallecido a los 55 años.
4	M	15/15		III	Ritmo sinusal. QRS: 80 ms. Ondas T negativas en V5, V6, I y aVL.	DTDVI: 74 mm; DTDVlp: 156%; FEVI 20%.			IC crónica. Tx electivo. Días desde la ECI: 15. Días en LE: 15.	Abuelo con MCD, fallecido a los 30 años.
5	M	60/61	TTN - NM_003319.4:c.75042_75 043delAG	II	Fibrilación auricular. QRS: 120 ms. TCIV. Ondas T negativas en V5 y V6.	DTDVI: 80 mm; DTDVlp: 176%; FEVI 30%. VD normal.	Fibrilación auricular. EV frecuentes.	3.4 METS. No arritmias.	IC crónica. Tx electivo. Días desde la ECI: 341. Días en LE: 92.	Sobrina con MCD, fallecida a los 60 años. Hermana con cardiopatía, fallecida súbitamente a los 33 años. Sobrino con MCD borderline a los 58 años.
6	M	56/56	DMD - NM_004006.2:c.4069G>T	IV	Ritmo sinusal. QRS: 150 ms. BRIHH.	FEVI 15%.	TVNS, TVS.		IC crónica. Múltiples TVS. Tx urgente por tormenta arrítmica. Días en LE: 30.	Hermano con MCD, Tx a los 68 años. Sobrino con MCD, fallecido a los 18 años en LE.
7	M	59/59	TTN - NM_003319.4:c.75042_75 043delAG ABCC9 - NM_005691:c.4570_4572delTTAinsAAAT	II	Fibrilación auricular. QRS: 120 ms. BRIHH.	DTDVI: 80 mm; DTDVlp: 166%; FEVI 20%. VD normal.	Fibrilación auricular. TVNS, TVS.		IC crónica. Tx electivo. TVNS y TVS. Días desde la ECI: 46. Días en LE: 6.	Primo con MCD y Tx. Padre y tía paterna con IC.
8	M	46/46		III	Ritmo sinusal. Ritmo ventricular estimulado.	DTDVI: 75 mm; DTDVlp: 156%; FEVI 21%. VD dilatado, FEVD 20%.		3.4 METS. EV en la recuperación.	IC crónica. Tx urgente por empeoramiento estando en LE. Días desde la ECI: 243. Días en LE: 223.	Hermano con MCD, Tx a los 35 años.

9	F	37/37	LMNA - NM_170707.3:c.569G>A TTN - NM_003319.4:c.60310_60 314delCAAGT DSP - NM_004415.2:c.2720G>A	IV	Ritmo sinusal. QRS: 60 ms. Ondas T negativas en V5 y V6.	DTDVI: 44 mm; DTDVIp: 99%; FEVI 18%. Disfunción de VD.			Presentación con shock cardiogénico. BiVAD puente al TxC. TxC urgente. Días desde la ECI: 10. Días en LE: 6.	Madre con MCD a los 64 años. Dos tías maternas con MSC a los 16 y 24 años.
10	M	51/52	FLNC - NM_001458.4:c.6231delT DSP - NM_004415.2:c.6881C>G	III	Ritmo sinusal. QRS: 130 ms. BRIHH.	DTDVI: 83 mm; DTDVIp: 179%; FEVI 27%. VD dilatado.			IC crónica. TxC electivo. Días desde la ECI: 163. Días en LE: 149.	Hermano con MCD a los 58 años.
11	M	45/45	BAG3 - NM_004281.3:c.361C>T ACTN2 - NM_001103.2:c.1040C>T	III	Ritmo sinusal. QRS: 80 ms.	DTDVI: 58 mm; DTDVIp: 129%; FEVI 37%. VD dilatado.	MSC recuperada.		IC crónica. MSC recuperada. TxC urgente por empeoramiento estando en LE. Días desde la ECI: 70. Días en LE: 61.	Hermano e hijo con MSC a los 45 y 24 años. 2 primos con MCH. Tía con MSC a los 45 años.
12	M	64/64	BAG3 - NM_004281.3:c.382_383in sAG	IV		DTDVI 77 mm; FEVI 20%. Dilatación y disfunción de VD.	TVNS, TVS, MSC recuperada.		IC crónica. TxC urgente por MSC recuperada y shock cardiogénico. Días desde la ECI: 2. Días en LE: 2.	1 hermano y 1 hermana con MSC a los 33 y 22 años. 1 hermano con MCD, fallecido a los 33 años. 2 sobrinos y 1 sobrina con MCD.
13	M	18/18	BAG3 - NM_004281.3:c.1316_131 7delTA	IV	Ritmo sinusal. QRS: 80 ms. TCIV. Ondas T negativas en V5, V6 y aVL.	DTDVI: 75 mm; DTDVIp: 158%; FEVI 15%. Dilatación y disfunción de VD.			IC aguda. TxC urgente. Días desde la ECI: 8. Días en LE: 3.	Madre y abuela materna con MCD: madre en LE a los 50 años; abuela fallecida a los 57 años.
14	M	49/50	EMD - NM_000117.2:c.77T>C	III	Ritmo sinusal. QRS: 80 ms. TCIV. Ondas T negativas en V5, V6, I y aVL.	DTDVI: 62 mm; DTDVIp: 139%; FEVI 11%. FEVD 28%.	TVNS. BAV completo.	3.5 METS. TVNS.	IC crónica. TxC electivo. Días desde la ECI: 107. Días en LE: 56.	1 hermano con MCD, TxC a los 54 años. 1 hermano con MCD, fallecido a los 33 años.
15	M	16/16	BAG3 - NM_004281.3:c.903delG	IV	Ritmo sinusal. QRSd: 100 ms. Ondas T negativas en V5, V6, II y aVF.	DTDVI: 75 mm; DTDVIp: 155%; FEVI 15%.	TVNS.		IC aguda. TxC urgente. Días en LE: 12.	Madre y tía materna con MCD, a los 50 y 44 años.
16	F	11/11	PKP2 - NM_004572.3:c.223+1G>A PKP2 - NM_004572.3:c.156G>C	IV	Ritmo sinusal. QRS: 80 ms. TCIV. Ondas T negativas en V5, V6, I y aVL.	DTDVI: 48 mm; DTDVIp: 132%; FEVI 17%.			IC crónica. Shock cardiogénico. TxC urgente. Días desde la ECI: 1. Días en LE: 0.	Hermano con MCD, TxC a los 11 años.

17	M	49/50	TNNT2 - NM_001001430.1:c.422G> A TTN - NM_003319.4:c.12052G>T	IV	Ritmo sinusal. QRS: 120 ms. BRIHH.	DTDVI: 66 mm; DTDVIp: 137%; FEVI 14%. Dilatación y disfunción de VD.		4.7 METS. No arritmias.	IC crónica. TxC electivo. Días desde la ECI: 192. Días en LE: 172.	Hermano con MCD. Sobrino con MCD borderline.
18	M	33/33	TTN - NM_003319.4:c.56232_56 233insTTGTCGAAAAACGAT AAACTACA FLNC - NM_001458.4:c.6617G>A	III	Ritmo sinusal. QRS: 80 ms. TCIV. Ondas T negativas en V1, V5 y V6.	DTDVI: 66 mm; DTDVIp: 135%; FEVI 20%. Dilatación y disfunción de VD.	TVNS.	No arritmias.	IC crónica. VAD puente al TxC. TxC urgente. Días desde la ECI: 58. Días en LE: 11.	Tío y familiar lejano paternos con MCD. Padre con MCD borderline.
19	M	49/50	TTN - NM_003319.4:c.48240G>A	III	Fibrilación auricular. QRS: 90 ms.	DTDVI: 67 mm; DTDVIp: 139%; FEVI 17%. FEVD 27%.	Fibrilación auricular. MSC recuperada.	7.8 METS. TVNS.	IC crónica. MSC recuperada. TxC electivo. Días desde la ECI: 61. Días en LE: 48.	Madre con miocardiopatía, MSC a los 52 años. 2 tíos maternos con MSC a los 30 y 32 años. Hija con MCD a los 31 años.
20	M	24/24	ACTN2 - NM_001103.2:c.26A>G	III	Ritmo sinusal. QRS: 100 ms. Ondas T negativas en V5, V6, aVL, II, III y aVF.	DTDVI: 78 mm; DTDVIp: 162%; FEVI 26%. VD dilatado, FEVD 18%.		6.6 METS. EV en el ejercicio.	IC crónica. TxC electivo. Días desde la ECI: 57. Días en LE: 47.	Hermano con MCD, TxC a los 27 años.
21	M	33/33	TTN - NM_003319.4:c.53521C>T	II	Ritmo sinusal. QRS: 80 ms. Ondas T negativas en V4, V5, V6 y aVL.	DTDVI: 71 mm; DTDVIp: 147%; FEVI 21%. FEVD 17%.	TVNS.	6.3 METS. No arritmias.	IC crónica. TxC urgente durante el ingreso por empeoramiento estando en LE. Días desde la ECI: 40. Días en LE: 8.	Madre, hermana y sobrino con MCD a los 79, 52 y 18 años.
22	M	26/27	TNNT2 - NM_001001430.1:c.586C> T	II	Ritmo sinusal. QRS: 100 ms.	DTDVI: 81 mm; DTDVIp: 176%; FEVI 21%. VD dilatado.		5.7 METS. No arritmias.	IC crónica. TxC electivo. Días desde la ECI: 88. Días en LE: 64.	Padre con MCD, fallecido a los 66 años. Tío y abuela con MCD. 6 parientes lejanos con MCD (2 MSC a los 35 y 49 años, 1 fallecido a los 60 años).
23	F	46/46	LMNA - NM_170707.3:c.961C>T	III	Ritmo sinusal. Ritmo ventricular estimulado.	DTDVI: 57 mm; DTDVIp: 126%; FEVI 18%. VD dilatado.	TVNS. Fibrilación auricular. ENS.	5 METS. EV en el ejercicio. TVNS.	IC crónica. TxC electivo. Días desde la ECI: 38. Días en LE: 37.	Madre con MSC a los 35 años. Primo MCD a los 52 años. Hermana y tío con alteración de la conducción.
24	M	33/33	TNNC1 - NM_003280.2:c.400G>A DSG2 - NM_001943.3:c.1174G>A DSC2 - NM_024422.3:c.2194T>G	IV	Ritmo sinusal. QRS: 90 ms. Ondas T negativas en V1, V2, V5, V6 y aVL.	DTDVI: 71 mm; DTDVIp: 159%; FEVI 27%. Dilatación y disfunción de VD.			IC crónica. TxC urgente tras empeoramiento agudo a la espera de estudio pretrasplante. Días desde la ECI: 7. Días en LE: 2.	Madre con MCD, fallecida a los 38 años. Hermana con MCD a los 34 años.

25	M	40/40	MYH6 - NM_002471.3:c.49C>T	III	Ritmo sinusal. QRS: 200 ms. BRIHH.	DTDVI: 75 mm; DTDVIp: 148%; FEVI 20%. FEVD 18%.	TVNS.	3.6 METS. No arritmias.	IC crónica. TxC electivo. Días desde la ECI: 178. Días en LE: 142.	Madre con MCD. Tía materna con cardiopatía (probable MCD).
26	M	36/37	PSEN2 - NM_000447.2:c.389C>T	IV	Ritmo sinusal. QRSd: 160 ms. BRIHH.	DTDVI: 99 mm; FEVI 21%.			IC crónica. TxC electivo. Días desde la ECI: 65.	Primo con MCD, fallecido a los 20 años.
27	M	60/60	FLNC- NM_001458.4:c.4106_410 7insA	IV	Fibrilación auricular. QRS: 80 ms. TCIV. Ondas T negativas en V4, V5, V6, I, aVL, II y III.	DTDVI: 82 mm; DTDVIp: 177%; FEVI 32%. VD dilatado, FEVD 10%.	Fibrilación auricular. TVS.	6.7 METS. EV en el ejercicio.	TVS 20 años. IC crónica. TxC urgente por empeoramiento estando en LE. Días desde la ECI: 59. Días en LE: 59.	Padre e hijo con MSC, a los 35 y 41 años.
28	M	56/56	EMD - NM_000117.2:c.77T>C	III	Fibrilación auricular. Ritmo ventricular estimulado.	DTDVI: 64 mm; DTDVIp: 145%; FEVI 25%. Disfunción de VD.	Fibrilación auricular. BAV	3.6 METS. No arritmias.	IC crónica. TxC electivo. Días desde la ECI: 27. Días en LE: 25.	Hermano con probable MCD, MSC a los 44 años. Sobrino con MCD, TxC a los 35 años.
29	M	57/57	MYBPC3 - NM_000256.3:c.3742G>A	III	Ritmo sinusal. QRS: 100 ms. TCIV. Ondas T negativas en V5, V6, I y aVL.	FEVI 19%. Disfunción de VD.		1.8 METS. No arritmias.	IC crónica. TxC electivo. Días desde la ECI: 47. Días en LE: 12.	Padre, hermano, hijo e hija con MCD. Hermano MSC a los 22 años. Nieto y 2 sobrinos con MCD. Varios parientes lejanos con MCD.
30	F	30/30		IV	Ritmo sinusal. QRS: 80 ms. Ondas T negativas en V1, V5, V6, I, aVL, II, III y aVF.	DTDVI: 60 mm; DTDVIp: 138%; FEVI 18%. Dilatación y disfunción de VD.	TVNS.	6.6 METS. No arritmias.	Diagnóstico neonatal. IC a los 30 años. TxC electivo. Días desde la ECI: 66. Días en LE: 48.	Hermana gemela con MCD, fallecida con 1 año de edad. Madre con MCD periparto, fallecida a los 25 años.
31	M	51/51	EMD - NM_000117.2:c.77T>C	III		FEVI 23%.			IC crónica. TxC electivo.	Hermano con MCD y TxC.
32	M	49/49	EMD - NM_000117.2:c.77T>C	IV	Fibrilación auricular. Ritmo ventricular estimulado.	DTDVI: 56 mm; DTDVIp: 128%; FEVI 27%.	Fibrilación auricular. BAV completo.		IC crónica. TxC urgente por empeoramiento agudo. Días en LE: 11.	3 hermanos con MCD. Tío con MSC a los 33 años.
33	M	16/16	DSC2 - NM_024422.3:c.13C>T VLC - NM_014000.2:c.1433A>G	III	Ritmo sinusal.	FEVI 25%.		5.6 METS. No arritmias.	IC crónica. TxC electivo. Días desde la ECI: 179. Días en LE: 66.	Hermano con MCD, TxC a los 14 años. Padre con MCD a los 63 años.
34	M	48/48	MYBPC3 - NM_000256.3:c.594C>A	III	Fibrilación auricular. QRS: 100 ms. TCIV. Ondas T negativas en V5 y V6.	DTDVI: 75 mm; DTDVIp: 147%; FEVI 15%. Dilatación y disfunción de VD.	Fibrilación auricular, flutter auricular.	3.7 METS. No arritmias.	IC crónica. TxC electivo. Días desde la ECI: 223.	Padre con MCD.

35	M	55/55	EMD - NM_000117.2:c.77T>C	IV	Fibrilación auricular. Ritmo ventricular estimulado.	DTDVI: 57 mm; DTDVIp: 127%; FEVI 40%.	Fibrilación auricular. TVS. ENS.	2.9 METS. No arritmias.	IC crónica. TxC electivo. Días desde la ECI: 40.	4 hermanos con MCD (2 con MSC a los 50 años). 2 sobrinos con MCD, 1 TxC a los 35 años.
36	M	44/45		III	Ritmo sinusal. QRS: 90 ms. TCIV. Ondas T negativas en V5, V6, I y aVL.	DTDVI: 64 mm; DTDVIp: 134%; FEVI 25%. VD dilatado, FEVD 39%.	TVNS.	5.4 METS. EV en el ejercicio.	IC crónica. TxC electivo. Días desde la ECI: 365. Días en LE: 341.	2 hermanas con MCD a los 35 años. 1 hermano con miocardiopatía con IC, fallecido a los 21 años.
37	M	22/22	MYH7 - NM_000257.2:c.1618T>C	III	Ritmo sinusal. QRS: 100 ms. TCIV.	DTDVI: 110 mm; DTDVIp: 218%; FEVI 23%. VD normal.		7.3 METS. No arritmias.	IC crónica. TxC electivo. Días desde la ECI: 208. Días en LE: 29.	Padre, 3 tíos/as y 2 primos/as con MCD. Padre con MSC a los 56 años.
38	M	54/54		III	Fibrilación auricular. Ritmo ventricular estimulado.	DTDVI: 86 mm; DTDVIp: 187%; FEVI 27%. FEVD 29%.	Fibrilación auricular.	5.5 METS. No arritmias.	IC crónica. TxC electivo. Días desde la ECI: 50. Días en LE: 23.	Padre, 4 hermanos y 2 hermanas con MCD.
39	M	39/40	EMD - NM_000117.2:c.77T>C	III	Ritmo sinusal. QRS: 120 ms. TCIV.	DTDVI: 64 mm; DTDVIp: 138%; FEVI 20%. FEVD 20%.	TVS.	3.4 METS. TVNS.	IC crónica. TxC electivo. Días desde la ECI: 269. Días en LE: 255.	2 hermanos con MCD a los 43 y 45 años (1 TxC).
40	M	57/57	EMD - NM_000117.2:c.77T>C	IV	Fibrilación auricular. QRS: 130 ms. TCIV.	DTDVI: 50 mm; DTDVIp: 120%; FEVI 25%. Dilatación y disfunción de VD.	Fibrilación auricular. ENS.		IC crónica. TxC urgente por empeoramiento clínico. Días desde la ECI: 16. Días en LE: 4.	2 parientes lejanos con MCD y TxC.
41	M	49/52	DSP - NM_004415.2:c.5851C>T	III	Ritmo sinusal. QRS: 110 ms. Ondas T negativas en V4, V5, V6, II, III y aVF.	FEVI 12%. Dilatación y disfunción de VD.	TVNS.	EV en el ejercicio.	IC crónica. TxC electivo. Días desde la ECI: 969. Días en LE: 944.	Hermano con MCD, MSC a los 40 años.
42	M	32/32	EMD - NM_000117.2:c.77T>C	IV	Ritmo sinusal. QRS: 100 ms. TCIV.	DTDVI: 56 mm; DTDVIp: 122%; FEVI 22%. VD dilatado, FEVD 12%.	TVNS, TVS, MSC recuperada.	5.4 METS. No arritmias.	IC crónica. TxC urgente por empeoramiento clínico. Días desde la ECI: 112. Días en LE: 37.	Abuelo con MCD, fallecido a los 50 años. Hermano con MSC.
43	M	43/44	EMD - NM_000117.2:c.77T>C BAG3 - NM_004281.3:c.343C>T	IV	Ritmo sinusal. Ritmo ventricular estimulado.	FEVI 10%.	TVNS sintomática.	No arritmias.	IC crónica. TxC electivo. Días desde la ECI: 349.	Tío con MCD. Hermano y primo con MSC a los 34 y 50 años. Pariente lejano con MCD y TxC.

44	M	48/50	EMD - NM_000117.2:c.77T>C	III	Fibrilación auricular. Ritmo ventricular estimulado.	DTDVI: 63 mm; DTDVlp: 134%; FEVI 25%. Dilatación y disfunción de VD.	Fibrilación auricular, ENS.	3.9 METS. No arritmias.	IC crónica. TxC electivo. Días desde la ECI: 954. Días en LE: 938.	Hermano con MCD.
45	M	37/37	EMD - NM_000117.2:c.77T>C DSP - NM_004415.2:c.2186T>C	III	Ritmo sinusal. BRIHH.	FEVI 10%.		No arritmias.	IC crónica. TxC electivo. Días desde la ECI: 108.	Abuelo con MCD. Pariente lejano con MSC a los 50 años.
46	M	46/46	EMD - NM_000117.2:c.77T>C	III		FEVI 24%.			IC crónica. TxC electivo. Días desde la ECI: 37.	2 hermanos y 2 sobrinos con TxC. 1 sobrino con MSC a los 21 años.
47	M	38/44	EMD - NM_000117.2:c.77T>C	III	Fibrilación auricular. Ritmo ventricular estimulado.	DTDVI: 65 mm; FEVI 15%. Dilatación y disfunción de VD.	Fibrilación auricular.	4.4 METS. No arritmias.	IC crónica. TxC electivo. Días desde la ECI: 2151. Días en LE: 3.	Madre con MCD, fallecida a los 50 años. Abuelo con cardiopatía, fallecido a los 30 años.
48	M	25/25	TPM1 - NM_001018005.1:c.337C> G	IV	Ritmo sinusal.	DTDVI: 83 mm; DTDVlp: 166%; FEVI 21%. VD normal.	TVNS.	5.7 METS. No arritmias.	IC crónica. TxC electivo. Días desde la ECI: 126. Días en LE: 43.	2 primos y 1 primo segundo con MCD a los 40, 36 y 1 año. Tío MSC a los 30 años. Padre con MCD borderline.
49	M	12/13		IV	Ritmo sinusal. QRS: 100 ms.	DTDVI: 81 mm; DTDVlp: 178%; FEVI 25%.			IC crónica. TxC urgente por empeoramiento clínico. Días desde la ECI: 1436. Días en LE: 29.	Hermano con MCD, TxC a los 19 años. Hermano con MCD borderline. Pariente lejano con MCD y TxC.
50	M	56/60	TTN - NM_003319.4:c.23997_23 998insT	IV	Ritmo sinusal. QRS: 200 ms.	DTDVI: 67 mm; DTDVlp: 143%; FEVI 21%. VD normal.	TVNS.	4.1 METS. EV en ejercicio y recuperació n.	IC crónica. TxC electivo. Días desde la ECI: 85. Días en LE: 79.	Hermano con MCD y TxC a los 60 años.
51	M	42/42	TTN - NM_003319.4:c.39059C>A	IV	Ritmo sinusal. TCIV.	DTDVI: 71 mm; DTDVlp: 143%; FEVI 17%.	TVNS, TVS.		IC crónica. TxC electivo. Días desde la ECI: 1614. Días en LE: 59.	Hermano con MCD a los 48 años. Madre con MCD borderline.
52	M	50/52	LMNA - NM_170707.3:c.568C>T DMD - NM_004006.2:c.2057C>T	II	Ritmo sinusal. QRS 120 ms.	DTDVI: 64 mm; DTDVlp: 137%; FEVI 30%. VD normal.	TVNS, TVS.	3.6 METS. EV en ejercicio y recuperació n.	IC crónica. VAD puente al TxC. TxC urgente. Días desde la ECI: 753. Días en LE: 200.	Madre, 4 hermanos/as, 2 tíos, 2 primos y 1 sobrino con MCD (1 de los hermanos TxC a los 55 años). 1 hermana con distrofia muscular.

M masculino; F, femenino; ECI, evaluación cardiológica inicial; TxC, trasplante cardíaco; NYHA, clase funcional de la New York Heart Association; ECG, electrocardiograma; QRS, duración del QRS; HARI, hemibloqueo anterior de rama izquierda del haz de His; BRIHH, bloqueo de rama izquierda del haz de His; TCIV, trastorno de conducción intraventricular; VI, ventrículo izquierdo; VD, ventrículo derecho; DTDVI, diámetro telediastólico de ventrículo izquierdo; DTDVlp, diámetro telediastólico de ventrículo izquierdo predicho por la fórmula de Henry et al¹⁴; FEVI, fracción de eyección ventrículo izquierdo; FEVD, fracción de eyección ventrículo derecho; BAV, bloqueo auriculoventricular; EV, extrasístole ventricular; TVNS, taquicardias ventriculares no sostenidas; TVS, taquicardias ventriculares sostenidas; MSC, muerte súbita cardíaca; ENS, enfermedad del nodo sinusal; METS, equivalentes metabólicos; IC, insuficiencia cardíaca; LE, lista de espera de TxC; BiVAD, asistencia ventricular biventricular; VAD, asistencia ventricular; MCD, miocardiopatía dilatada; MCH, miocardiopatía hipertrófica.

Tabla 7: Características clínicas basales de la población a estudio en el momento de la evaluación cardiaca inicial (ECI)

Características basales		
Sexo, masculino (%)		48 (92%)
Edad a la ECI, años		40,13 ± 14,35
Edad al TxC, años		40,73 ± 14,51
NYHA	I	2 (4%)
	II	6 (12%)
	III	24 (46%)
	IV	20 (38%)
ECG		
Ritmo sinusal, n (%)		37 (71%)
Fibrilación auricular, n (%)		13 (25%)
Duración QRS (ms)		107 ± 32
Transtornos de conducción (BRIHH, BRDHH, HARI, MP) (%)		19 (37%)
Ondas T negativas (%)		18 (35%)
Ecocardiograma		
DTDVI, mm		69,4 ± 11,2
DTDVIp, %		147,2 ± 19,2
FEVI, %		21,3 ± 6,5
Afectación de VD, n (%)		30 (58%)
Arritmias		
Arritmias ventriculares (sostenidas y no sostenidas), n (%)		23 (44%)
Arritmias auriculares, n (%)		14 (27%)
Bloqueo aurículo-ventricular, n (%)		11 (21%)
Curso clínico		
Insuficiencia cardiaca aguda, n (%)		4 (8%)
Insuficiencia cardiaca crónica, n (%)		48 (92%)
Arritmias ventriculares sostenidas o MSC, n (%)		12 (23%)
TxC electivo, n (%)		34 (65%)
TxC urgente, n (%)		18 (35%)
Tiempo en lista de espera, días		98 ± 196
Tiempo desde la ECI al TxC, días		237 ± 409
Historia familiar		
MCD en la familia (%)		51 (98%)
MSC en la familia (%)		20 (38%)
Criterios MCD familiar		52 (100%)
Variantes genéticas en la clasificación final		
Mutaciones patogénicas, n (%)		38 (73%)
Dobles mutaciones, n (%)		13 (25%)

Tabla 8: Características histopatológicas de los pacientes índice*

Paciente	Grasa en VI	Fibrosis en VI	Espesor de la fibrosis en VI	Grasa en VD	Fibrosis en VD	Espesor de la fibrosis en VD	Infiltrados linfocitarios	Localización de los infiltrados linfocitarios	Degeneración de miocitos†	Criterios de miocarditis††
1	0	0		0	1	<25%	0		0	0
2	1	1	<25%	0	0		0		0	0
3	0	1	50-75%	0	1	50-75%	0		0	0
4	0	0		0	0		0		0	0
5	0	1	<25%	1	1	<25%	1	Intersticial difuso	0	0
6	1	1	>75%	1	1	<25%	0		0	0
7	0	0		0	0		0		0	0
8	0	0		0	0		0		0	0
9	0	0		0	0		0		0	0
10	1	1	25-50%	0	0		0		0	0
11	0	0		0	0		0		0	0
12	0	0		0	0		0		0	0
13	0	0		0	0		1	Intersticial	0	0
14	0	0		0	0		0		0	0
15	0	0		0	0		0		0	0
16	0	1	50-75%	0	0		0		0	0
17	0	1	50-75%	0	1	25-50%	0		0	0
18	0	0		0	0		0		1	0
19	0	1	50-75%	0	0		1	En VD: difuso. En VI, en zonas de fibrosis.	0	0
20	0	1	50-75%	0	1	50-75%	0		0	0
21	0	1	<25%	0	0		0		0	0
22	0	0		0	0		0		0	0
23	0	1	>75%	0	1	<25%	0		0	0
24	0	0		0	0		0		0	0
25	0	1	<25%	0	1	<25%	0		0	0
26	0	0		1	0		0		0	0
27	0	0		0	0		0		0	0
28	0	1	25-50%	1	1	<25%	0		0	0
30	0	0		0	0		0		0	0
52	0	0		0	0		0		0	0

*Disponible para 30 de los pacientes.

1: Presente. 0: Ausente. †Degeneración de miocitos se refiere a vacuolización intracitoplasmática o pérdida de miocitos. ††: Criterios de Dallas [3].

Tabla 9: Características histopatológicas resumidas

Características histopatológicas de los corazones explantados*	
Tejido graso en el VI, n (%)	3 (10%)
Fibrosis en el VI, n (%)	13 (43%)
Infiltración fibroadiposa <25% de la pared del VI, n (%)	4 (13%)
Infiltración fibroadiposa 25-50% de la pared del VI, n (%)	2 (7%)
Infiltración fibroadiposa 50-75% de la pared del VI, n (%)	5 (17%)
Infiltración fibroadiposa >75% de la pared del VI, n (%)	2 (7%)
Tejido graso en el VD, n (%)	4 (13%)
Fibrosis en el VD, n (%)	9 (30%)
Infiltración fibroadiposa <25% de la pared del VD, n (%)	6 (20%)
Infiltración fibroadiposa 25-50% de la pared del VD, n (%)	1 (3%)
Infiltración fibroadiposa 50-75% de la pared del VD, n (%)	2 (7%)
Infiltración fibroadiposa >75% de la pared del VD, n (%)	0 (0%)
Infiltrado linfocitario en VI o VD, n (%)	0 (0%)
Degeneración de miocitos (vacuolización de citoplasma o pérdida de miocitos)	1 (3%)

*Disponible para 30 de los pacientes.

5.2 – Resultados genéticos

5.2.1 - Resultados genéticos iniciales

Pacientes con MP: Inicialmente, se encontraron 24 MP en 21 pacientes (40%) (tabla 10). Tres pacientes presentaban 2 MP en diferentes genes y en 6 pacientes se encontraron también VSI. 18 de las MP (75%) eran mutaciones que provocaban un truncamiento de la proteína, ninguna de ellas previamente descrita en la literatura. 10 de estas mutaciones afectaban al gen de la TTN, 4 eran mutaciones en BAG3, 2 afectaban a la FLNC y las otras a la DMD y DPK. Otra era una mutación ya descrita anteriormente, que causaba splicing anormal y un stop codon (truncamiento) prematuro en PKP2. 3 eran variantes missense, descritas anteriormente y no encontradas en controles, 2 en LMNA y 1 en TNNT2. 2 eran mutaciones tipo stop codon previamente descritas, en LMNA y ABCC9.

Pacientes con VSI: 25 pacientes (48%) presentaban 19 VSI (Tabla 11). Doce eran nuevas variantes missense, no presentes en controles y 7 eran mutaciones previamente descritas como causa de MCD, pero que se habían encontrado asimismo en controles (Tabla 11).

Pacientes sin variantes: Por último, en 6 pacientes (12%) no se encontraron variantes genéticas en los genes relacionados con MCD analizados.

Genes no relacionados con MCD: Además, se identificaron varias variantes genéticas relevantes en otros genes relacionados con patología cardiovascular (Tabla 12).

5.2.2 - Evaluación familiar

La evaluación familiar comprendió el estudio clínico y genético de 220 familiares de 36 de las 46 familias con MP o VSI (78%) (Apéndice 1). En 14 de los pacientes con MP, el estudio familiar confirmó la patogenicidad de las mutaciones mediante cosegregación (Figura 6, Apéndice 1 y Tabla 10). Entre los pacientes con VSI, la evaluación familiar permitió reclasificar las VSI como MP en 17 familias y como no patogénicas en 3 casos (Apéndice 1 y Tabla 11). El estudio de cosegregación no fue posible en tres pacientes con VSI y no fue concluyente en otros dos pacientes.

Tabla 10: Variantes genéticas inicialmente clasificadas como mutaciones patogénicas

Gen	Mutación*	Efecto de la mutación a nivel proteico	Paciente	Descripción previa	Descripción en controles	Conservación	Predictor SIFT (score)	Predictor Polyphen-2 (score)	Predictor Mutation Taster (score)	Predictor MetaSVM	Predictor MetaLR	Consecuencia	Cosegregación	Clasificación final
ABCC9	NM_005691:c.4570_4572delTTAinsAAAT	Leu1524Lysfs*5	7	Sí	No	-	-	-	-	-	-	Frameshift con truncamiento	No demostrada	Mutación patogénica
BAG3	NM_004281.3:c.361C>T	Arg121*	11	No	No	-	-	-	-	-	-	Mutación nonsense	No demostrada	Mutación patogénica
BAG3	NM_004281.3:c.382_383insAG	Ala128Glu fs*84	12	No	No	-	-	-	-	-	-	Frameshift con truncamiento	Sí	Mutación patogénica
BAG3	NM_004281.3:c.1316_1317delTA	Val439Glyfs*4	13	No	No	-	-	-	-	-	-	Frameshift con truncamiento	Sí	Mutación patogénica
BAG3	NM_004281.3:c.903delG	Arg301Serfs*6	15	No	No	-	-	-	-	-	-	Frameshift con truncamiento	Sí	Mutación patogénica
DMD	NM_004006.2:c.4069G>T	Glu1357*	6	No	No	-	-	-	-	-	-	Mutación nonsense	Sí	Mutación patogénica
DSP	NM_004415.2:c.5851C>T	Arg1951*	41	No	No	-	-	-	-	-	-	Mutación nonsense	No demostrada	Mutación patogénica
FLNC	NM_001458.4:c.6231delT	Ser2077Argfs*50	10	No	No	-	-	-	-	-	-	Frameshift con truncamiento	Sí †	Mutación patogénica
FLNC	NM_001458.4:c.4106_4107insA	Asn1369Lysfs*36	27	No	No	-	-	-	-	-	-	Frameshift con truncamiento	No demostrada	Mutación patogénica
LMNA	NM_170707.3:c.569G>A	Arg190Gln	9	Sí	No	Elevada	Afecta a la función proteica (0.00)	Probablemente dañina (0.998)	Probablemente causal (1.000)	Deletérea (0.95405)	Deletérea (0.94929)	Mutación missense	No demostrada	Mutación patogénica
LMNA	NM_170707.3:c.961C>T	Arg321*	23	Sí	No	-	-	-	-	-	-	Mutación nonsense	Sí	Mutación patogénica

LMNA	NM_170707.3:c.568C>T	Arg190Trp	52	Sí	No	Elevada	Afecta a la función proteica (0.00)	Probablemente dañina (0.958)	Probablemente causal (1.000)	Deletérea (0.95656)	Deletérea (0.95368)	Mutación missense	No demostrada	Mutación patogénica
PKP2	NM_004572.3:c.223+1G>A		16	Sí	No	-	-	-	-	-	-	Splicing anormal	No demostrada	Mutación patogénica
TNNT2	NM_001001430.1:c.422G>A	Arg141Gln	17	Sí	No	Elevada	Tolerada (0.22)	Probablemente dañina (1.000)	Probablemente causal (1.000)	Deletérea (0.99590)	Deletérea (0.98918)	Mutación missense	Sí †	Mutación patogénica
TTN	NM_003319.4:c.39059C>A	Ser13020*	51	No	No	-	-	-	-	-	-	Mutación nonsense	Sí	Mutación patogénica
TTN	NM_003319.4:c.13000A>T	Arg4334*	2	No	No	-	-	-	--	-	-	Mutación nonsense	No demostrada	Mutación patogénica
TTN	NM_003319.4:c.75042_75043delAG	Arg25014Serfs*4	5	No	No	-	-	-	-	-	-	Frameshift con truncamiento	Sí	Mutación patogénica
TTN	NM_003319.4:c.59900delC	Pro19967Leufs*8	7	No	No	-	-	-	-	-	-	Frameshift con truncamiento	No demostrada	Mutación patogénica
TTN	NM_003319.4:c.60310_60314delCAAGT	Gln20104Tyrfs*17	9	No	No	-	-	-	-	-	-	Frameshift con truncamiento	Sí †	Mutación patogénica
TTN	NM_003319.4:c.12052G>T	Glu4018*	17	No	No	-	-	-	-	-	-	Mutación nonsense	Sí †	Mutación patogénica
TTN	NM_003319.4:c.56232_56233insTTGTCGAAAAACGATAAACTACA	Arg18745Leufs*69	18	No	No	-	-	-	-	-	-	Frameshift con truncamiento	Sí †	Mutación patogénica
TTN	NM_003319.4:c.48240G>A	Trp16080*	19	No	No	-	-	-	-	-	-	Mutación nonsense	Sí	Mutación patogénica
TTN	NM_003319.4:c.53521C>T	Arg17841*	21	No	No	-	-	-	-	-	-	Mutación nonsense	Sí	Mutación patogénica
TTN	NM_003319.4:c.23997_23998insT	Lys8000*	50	No	No	-	-	-	-	-	-	Frameshift con truncamiento	No demostrada	Mutación patogénica

* Las variantes se refieren a (GRCh37.p13)

† Cosegregación junto con otras mutaciones

Tabla 11: Variantes genéticas inicialmente clasificadas como variantes de significado incierto

Gen	Mutación*	Efecto de la mutación a nivel proteico	Paciente	Descripción previa	Descripción en controles	MAF (%)	Conservación	Predictor SIFT (score)	Predictor Polyphen-2 (score)	Predictor Mutation Taster (score)	Predictor MetaSVM	Predictor MetaLR	Consecuencia	Cosegregación	Clasificación final
ACTN2	NM_001103.2:c.1040C>T	Thr347Met	11	No	No	-	Elevada	Afecta a la función proteica (0.00)	Probablemente dañina (0.989)	Probablemente causal (1.000)	Tolerada (0.82062)	Tolerada (0.76274)	Mutación missense	No demostrada	VSI
ACTN2	NM_001103.2:c.26A>G	Gln9Arg	20	Sí	Sí	0.0538	Elevada	Tolerada (0.13)	Benigna (0.000)	Probablemente causal (0.576)	Tolerada (0.52701)	Tolerada (0.60210)	Mutación missense	No	No patogénica
BAG3	NM_004281.3:c.343C>T	Pro115Ser	43	Sí	Sí	-	Elevada	Tolerada (1.00)	Benigna (0.001)	Polimorfismo (1.000)	Tolerada (0.46943)	Tolerada (0.41653)	Mutación missense	No demostrada	VSI
DMD	NM_004006.2:c.2057C>T	Thr686Ile	52	No	No	-	Elevada	Tolerada (0.10)	Benigna (0.147)	Probablemente causal (1.000)	Deletérea (0.84110)	Deletérea (0.84839)	Mutación missense	No demostrada	VSI
DSC2	NM_024422.3:c.2194T>G	Leu732Val	24	Sí	Sí	0.1076	Media	Tolerada (0.15)	Benigna (0.005)	Polimorfismo (0.989)	Tolerada (0.42483)	Tolerada (0.30091)	Mutación missense	No demostrada	VSI
DSC2	NM_024422.3:c.13C>T	Arg5Cys	33	No	No	-	Baja	Tolerada (0.13)	Posiblemente dañina (0.642)	Polimorfismo (1.000)	Tolerada (0.48623)	Tolerada (0.43469)	Mutación missense	Sí	Mutación patogénica
DSG2	NM_001943.3:c.1174G>A	Val392Ile	24	Sí	Sí	0.1587	Baja	Tolerada (0.14)	Benigna (0.001)	Probablemente causal (0.000)	Tolerada (0.30110)	Tolerada (0.45019)	Mutación missense	No demostrada	VSI
DSP	NM_004415.2:c.2720G>A	Arg907His	9	No	No	-	Elevada	Afecta a la función proteica (0.00)	Benigna (0.008)	Probablemente causal (0.999)	Tolerada (0.03953)	Tolerada (0.13154)	Mutación missense	Sí +	VSI
DSP	NM_004415.2:c.6881C>G	Ala2294Gly	10	Sí	Sí	0.0231	Elevada	Afecta a la función proteica (0.00)	Probablemente dañina (0.920)	Probablemente causal (1.000)	Deletérea (0.91492)	Deletérea (0.91337)	Mutación missense	Sí +	VSI

DSP	NM_004415.2:c.2186T>C	Met729Thr	45	No	No	-	Media	Affects protein function (0.01)	Benigna (0.008)	Polimorfismo (0.667)	Tolerada (0.11568)	Tolerada (0.38830)	Mutación missense	No demostrada	VSI
EMD	NM_000117.2:c.77T>C	Val26Ala	14, 28, 31, 32, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 46, 47	No	No	-	Elevada	Tolerada (0.07)	Posiblemente dañina (0.595)	Polimorfismo (0.999)	Tolerada (0.51583)	Tolerada (0.53538)	Mutación missense	Sí	Mutación patogénica
FLNC	NM_001458.4:c.1412-6C>G	-	1	No	No	-	-	-	-	-			Potencial splicing anormal	No	No patogénica
FLNC	NM_001458.4:c.6617G>A	Arg2206Gln	18	No	No	-	Elevada	Afecta a la función proteica (0.04)	Benigna (0.105)	Probablemente causal (0.995)	Tolerada (0.77795)	Tolerada (0.69779)	Mutación missense	Sí +	VSI
MYBPC3	NM_000256.3:c.594C>A	Asp198Glu	34	No	No	-	Elevada	Afecta a la función proteica (0.00)	Benigna (0.194)	Probablemente causal (0.994)	Tolerada (0.45797)	Tolerada (0.54882)	Mutación missense	No demostrada	VSI
MYBPC3	NM_000256.3:c.3742G>A	Gly1248Arg	29	Sí	Sí	0.0245	Elevada	Afecta a la función proteica (0.00)	Posiblemente dañina (0.563)	Probablemente causal (1.000)	Tolerada (0.57248)	Tolerada (0.55821)	Mutación missense	No	No patogénica
MYH6	NM_002471.3:c.49C>T	Arg17Cys	25	No	No	-	Media	Afecta a la función proteica (0.00)	Probablemente dañina (0.955)	Probablemente causal (1.000)	Deletérea (0.93348)	Deletérea (0.92955)	Mutación missense	No demostrada	VSI
MYH7	NM_000257.2:c.1618T>C	Phe540Leu	37	No	No	-	Elevada	Afecta a la función proteica (0.00)	Benigna (0.030)	Probablemente causal (1.000)	Deletérea (0.90546)	Deletérea (0.92595)	Mutación missense	Sí	Mutación patogénica
MYPN	NM_032578.3:c.59A>G	Tyr20Cys	3	Sí	Sí	0.0923	Elevada	Afecta a la función proteica (0.00)	Probablemente dañina (0.998)	Probablemente causal (1.000)	Deletérea (0.84281)	Deletérea (0.85051)	Mutación missense	No demostrada	VSI

PKP2	NM_004572.3:c.156G>C	Lys52Asn	16	No	No	-	Baja	Tolerada (0.14)	Posiblemente dañina (0.780)	Probablemente causal (0.613)	Tolerada (0.82012)	Tolerada (0.80378)	Mutación missense	No demostrada	VSI
PSEN2	NM_000447.2:c.-21+5G>C	-	3	No	No	-	-	-	-	-	-	-	Potencial splicing anormal	No demostrada	VSI
PSEN2	NM_000447.2:c.389C>T	Ser130Leu	26	Sí	Sí	0.0692	Muy elevada	Afecta a la función proteica (0.02)	Posiblemente dañina (0.523)	Probablemente causal (1.000)	Deletérea (0.99930)	Deletérea (0.99139)	Mutación missense	No demostrada	VSI
TNNC1	NM_003280.2:c.400G>A	Glu134Lys	24	No	No	-	Elevada	Afecta a la función proteica (0.03)	Probablemente dañina (0.957)	Probablemente causal (1.000)	Tolerada (0.79147)	Tolerada (0.77201)	Mutación missense	No demostrada	VSI
TNNT2	NM_001001430.1:c.586C>T	Arg196Trp	22	No	No	-	Media	Afecta a la función proteica (0.01)	Probablemente dañina (0.978)	Probablemente causal (0.999)	Deletérea (0.93242)	Deletérea (0.94000)	Mutación missense	Sí	Mutación patogénica
TPM1	NM_001018005.1:c.337C>G	Leu113Val	48	No	No	-	Media	Afecta a la función proteica (0.00)	Posiblemente dañina (0.653)	Probablemente causal (1.000)	Deletérea (0.97416)	Deletérea (0.99548)	Mutación missense	Sí	Mutación patogénica
VCL	NM_014000.2:c.1433A>G	Asn478Ser	33	No	No	-	Muy elevada	Afecta a la función proteica (0.04)	Posiblemente dañina (0.755)	Probablemente causal (1.000)	Tolerada (0.08072)	Tolerada (0.35212)	Mutación missense	Sí †	VSI

* Las variantes se refieren a (GRCh37.p13)

† Cosegregación junto con otras mutaciones

Tabla 12: Variantes genéticas en genes no relacionados con MCD

Gen	Mutación*	Efecto de la mutación a nivel proteico	Paciente	Descripción previa	Descripción en controles	MAF (%)	Conservación	Predictor SIFT (score)	Predictor Polyphen-2 (score)	Predictor Mutation Taster (score)	Predictor MetaSVM	Predictor MetaLR	Consecuencia	Enfermedades relacionadas	Observaciones
AGL	NM_000642:c.1782C>G	Tyr594*	22	No	No	-	-	-	-	-	-	-	Mutación nonsense	Glucogenosis tipo III	Recesiva
ANK2	NM_001148:c.2663G>A	Arg888Gln	4	No	No	-	Elevada	Afecta a la función proteica (0.00)	Benigna (0.218)	Probablemente causal (0.997)	Tolerada (0.72486)	Tolerada (0.72143)	Mutación missense	SQTL, FV idiopática, disfunción sinusal, FA	
ANK2	NM_001148:c.10948G>C	Glu3650Gln	43	No	No	-	Elevada	Afecta a la función proteica (0.04)	Posiblemente dañina (0.882)	Probablemente causal (0.971)	Tolerada (0.76901)	Tolerada (0.74940)	Mutación missense	SQTL, FV idiopática	
CACNA1C	NM_199460:c.2381C>T	Pro794Leu	35	No	No	-	Elevada	Tolerada (0.81)	Benigna (0.102)	-	Deletérea (0.88577)	Deletérea (0.97427)	Mutación missense	SQTL, Brugada	
COL3A1	NM_000090:c.1526G>A	Arg509His	42	No	No	-	Elevada	Afecta a la función proteica (0.00)	Posiblemente dañina (0.999)	Probablemente causal (1.000)	Deletérea (0.92404)	Deletérea (0.91939)	Mutación missense	Ehler-Danlos IV	
COL5A1	NM_000093:c.431C>A	Thr144Lys	42	No	No	-	Elevada	Afecta a la función proteica (0.05)	Benigna (0.067)	Probablemente causal (0.629)	Tolerada (0.19826)	Tolerada (0.03315)	Mutación missense	Ehler-Danlos II	
ENG	NM_001114753:c.1019C>T	Pro340Leu	42	No	No	-	Elevada	Afecta a la función proteica (0.01)	Posiblemente dañina (0.588)	Polimorfismo (1.000)	Tolerada (0.48891)	Tolerada (0.52855)	Mutación missense	Rendu-Osler-Weber	
FKTN	NM_001079802:c.165+1G>A	-	38	No	No	-	-	-	-	-	-	-	Splicing anormal	Distrofia muscular	Recesiva
GATA4	NM_002052:c.973C>G	Leu325Val	4	No	No	-	Elevada	Tolerada (0.21)	Benigna (0.009)	Probablemente causal (1.000)	Deletérea (0.94430)	Deletérea (0.96197)	Mutación missense	Defectos cardíacos congénitos	
KCNE1	NM_000219:c.374C>T	Thr125Met	18	Sí	Sí	0.0231	Baja	Tolerada (0.26)	Benigna (0.009)	Polimorfismo (1.000)	Tolerada (0.68116)	Tolerada (0.75624)	Mutación missense	SQTL	

KCNH2	NM_000238:c.28 C>T	Pro10Ser	17	No	No	-	Media	Afecta a la función proteica (0.00)	Benigna (0.154)	Probablemente causal (0.545)	Deletérea (0.99925)	Deletérea (0.98941)	Mutación missense	SQTL	
PRKAG2	NM_016203:c.206 C>T	Pro69Leu	4	No	Sí	-	Baja	Tolerada (0.16)	Benigna (0.000)	Polimorfismo (0.921)	Tolerada (0.54901)	Tolerada (0.76315)	Mutación missense	MCH, trastornos de conducción, preexcitación	
PRKAG2	NM_016203:c.1024 G>C	Glu342Gln	11	No	No	-	Muy elevada	Afecta a la función proteica (0.03)	Posiblemente dañina (0.687)	Probablemente causal (1.000)	Deletérea (0.96220)	Deletérea (0.95535)	Mutación missense	MCH, trastornos de conducción, preexcitación	Causa MCH en 2 familiares
RANGRF	NM_016492:c.1617 delGA	Asp6Leufs*18	48	No	No	-	-	-	-	-	-	-	Frameshift con truncamiento	Brugada	
RYR2	NM_001035:c.3038 G>A	Arg1013Gln	18	Sí	Sí	0.0905	Elevada	Afecta a la función proteica (0.00)	Posiblemente dañina (0.874)	Probablemente causal (0.948)	Tolerada (0.82078)	Deletérea (0.86024)	Mutación missense	TVPC	
RYR2	NM_001035:c.5294 C>G	Ser1765Cys	27	No	No	0.0399	Elevada	Afecta a la función proteica (0.00)	Benigna (0.012)	Probablemente causal (0.998)	Tolerada (0.64794)	Tolerada (0.64794)	Mutación missense	TVPC	
RYR2	NM_001035:c.2711 A>G	Tyr904Cys	42	Sí	Sí	-	Elevada	Afecta a la función proteica (0.00)	Probably damaging (0.999)	Probablemente causal (1.000)	Deletérea (0.97391)	Deletérea (0.96627)	Mutación missense	TVPC	
SNTA1	NM_003098:c.459 G>T	Gln153His	40	No	No	-	Elevada	Afecta a la función proteica (0.03)	Posiblemente dañina (0.985)	Probablemente causal (1.000)	Tolerada (0.03707)	Tolerada (0.37938)	Mutación missense	SQTL	
TRPM4	NM_017636:c.2311 C>T	Arg771Cys	47	No	No	-	Elevada	Afecta a la función proteica (0.00)	Benigna (0.252)	Probablemente causal (0.999)	Deletérea (0.84163)	Tolerada (0.81035)	Mutación missense	Bloqueo cardíaco progresivo familiar	

* Las variantes se refieren a (GRCh37.p13)

MCH: Miocardiopatía hipertrófica; TVPC: Taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica; SQTL: Síndrome de QT largo; FV: Fibrilación ventricular

5.2.3 - Resultados genéticos finales

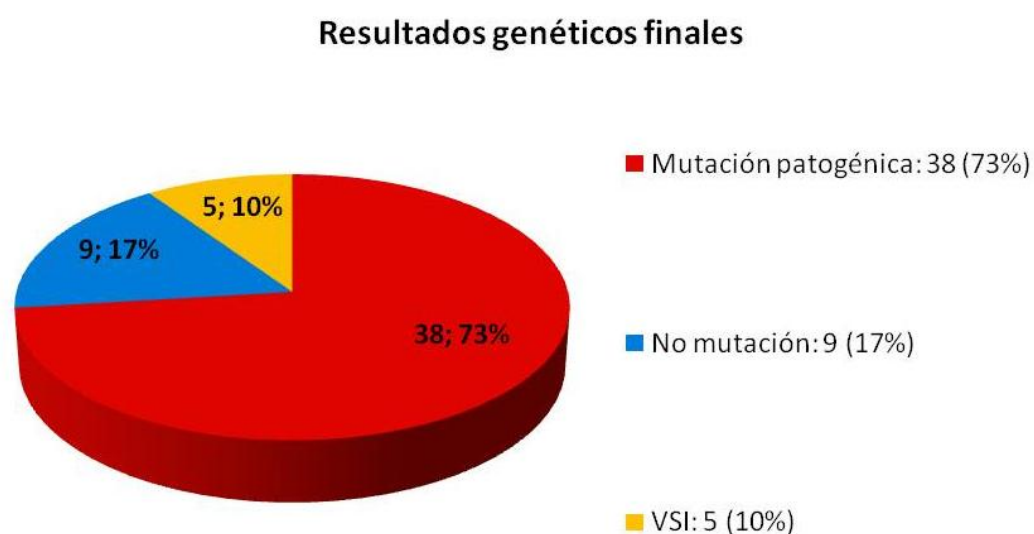
Al final del estudio, la mutación causal de la MCD se identificó en 38 pacientes (73%) (Tablas 10 y 11, Figura 7), 21 de ellos presentaban mutaciones inicialmente clasificadas como patogénicas, y 17 presentaban VSI cuya patogenicidad fue confirmada por estudio de cosegregación.

Los genes mutados fueron: EMD (13 pacientes), TTN (10), BAG3 (4), LMNA (3), FLNC (2), TNNT2 (2), DMD, DSC2, DSP, MYH7, PKP2, ABCC9 y TPM1.

Un total de 5 pacientes (10%) albergaba sólo VSI en los siguientes genes: PSEN2 (2), DSC2, DSG2, MYBPC3, MYH6, MYPN y TNNC1.

Por último, no se identificaron variantes genéticas relacionadas con MCD en 9 casos (17%).

Figura 7: Resultados genéticos finales



5.2.4 - Emerina

Entre las 17 familias con VSI que fueron reclasificadas a MP, 13 presentaban la misma mutación tipo missense en el gen de la Emerina, EMD (c.77T>C). Estos sujetos eran varones aparentemente no relacionados, sin fenotipo muscular, procedentes de la misma zona geográfica (isla de Tenerife). Presentaban una historia familiar con alta frecuencia de desarrollo de MCD, insuficiencia cardíaca, muerte súbita y TxC (Apéndice 1).

Se realizó un estudio de haplotipos en 9 pacientes con la mutación EMD c.77T>C, que fue consistente con un haplotipo compartido (Figura 8). Por lo tanto, se describió una nueva mutación fundadora.

Figura 8: Haplotipo compartido en las regiones en torno al gen EMD en los pacientes portadores de la mutación c.77T>C. La tabla muestra los haplotipos de 9 de los pacientes trasplantados. Los marcadores compartidos en las diferentes familias se muestran en gris.

[illegible]

5.3 – Características clínicas e histopatológicas de acuerdo a los hallazgos genéticos

Se realizó un estudio comparativo de diferentes características clínicas e histopatológicas en relación a los hallazgos genéticos. Se evaluaron en primer lugar las diferencias entre los 38 pacientes que presentaban al menos una mutación patogénica en la clasificación final, respecto a los 14 que presentaban únicamente VSI o no presentaban mutación (Tabla 13). Se objetivó que los pacientes con MP presentaban menos dilatación de ventrículo izquierdo y mayor prevalencia de arritmias ventriculares y muerte súbita. Sin embargo, presentaban menos historia familiar de muerte súbita.

En nuestra cohorte, 11 pacientes (21,2%) presentaban múltiples mutaciones, definido como una combinación de dos MP (5,8%) o de una MP con una VSI (15,4%). Se analizaron las diferencias entre estos pacientes con respecto a pacientes sin mutaciones múltiples (Tabla 14), sin objetivar diferencias significativas entre ambos grupos.

Tabla 13. Hallazgos clínicos e histológicos de los receptores de TxC por MCD familiar de acuerdo a los hallazgos genéticos: pacientes con mutaciones patogénicas vs pacientes sin mutaciones patogénicas.

Variable	Pacientes con mutaciones patogénicas (n=38)	Pacientes sin mutaciones patogénicas (n=14)	p
Edad al TxC, años	42,7 ± 14,5	35,5 ± 13,7	0,12
Sexo, masculino (%)	35 (92,1%)	13 (92,9%)	0,93
ECG			
Fibrilación auricular, n (%)	10 (26,3%)	12 (85,7%)	0,31
Duración QRS (ms)	105,7 ± 30,3	110,9 ± 37,0	0,66
Alteraciones de la conducción (%)	13 (34,2%)	6 (42,9%)	0,57
Ondas T negativas (%)	11 (28,9%)	7 (50,0%)	0,16
Ecocardiograma			
DTDVI, mm	66,6 ± 10,9	75,5 ± 9,69	0,02
DTDVlp, %	143,4 ± 19,9	155,6 ± 15,1	0,07
FEVI, %	21,2 ± 7,0	21,7 ± 5,4	0,79
Afectación de VD, n (%)	18 (47,4%)	8 (57,1%)	0,34
Arritmias			
Arritmias ventriculares, n (%)	20 (52,6%)	3 (21,4%)	0,04
Arritmias auriculares, n (%)	11 (28,9%)	3 (21,4%)	0,59
Bloqueo aurículo-ventricular, n (%)	8 (21,1%)	3 (21,4%)	0,98
Curso clínico			
Arritmias ventriculares sostenidas o MSC, n (%)	12 (31,6%)	0 (0%)	0,02
TxC urgente (%)	15 (39,5%)	3 (21,4%)	0,23
Historia familiar			
MCD en la familia (%)	37 (97,4%)	14 (100%)	0,54
MSC en la familia (%)	16 (36,9%)	14 (100%)	0,01
Histopatología[†]			
Tejido graso en el VI, n (%)	3 (14,3%)	0 (0%)	0,23
Fibrosis en el VI, n (%),	10 (47,6%)	3 (33,3%)	0,47
Infiltración fibroadiposa <50% de la	5 (23,8%)	1 (11,1%)	0,69

pared del VI, n (%)			
Infiltración fibroadiposa $\geq 50\%$ de la pared del VI, n (%)	5 (23,8%)	2 (22,2%)	0,69
Tejido graso en el VD, n (%)	3 (14,3%)	1 (11,1%)	0,82
Fibrosis en el VD, n (%)	5 (23,8%)	4 (44,4%)	0,26
Infiltración fibroadiposa $< 50\%$ de la pared del VD, n (%)	5 (23,8%)	2 (22,2%)	0,08
Infiltración fibroadiposa $\geq 50\%$ de la pared del VD, n (%)	0 (0%)	2 (22,2%)	0,08
Infiltrado linfocitario, n (%)	3 (14,3%)	0 (0%)	0,23

† Análisis histopatológico de los corazones explantados, disponible para 30 pacientes (21 con mutaciones patogénicas y 9 sin mutaciones patogénicas).

Tabla 14. Hallazgos clínicos e histológicos de los receptores de TxC por MCD familiar de acuerdo a los hallazgos genéticos: pacientes con mutaciones múltiples vs pacientes sin mutaciones múltiples.

Variable	Pacientes con mutaciones múltiples* (n=11)	Pacientes sin mutaciones múltiples (n=41)	p
Edad al TxC, años	39,6 ± 15,1	41,0 ± 14,5	0,78
Sexo, masculino (%)	9 (81,8%)	39 (95,1%)	0,14
ECG			
Fibrilación auricular, n (%)	1 (9,1%)	11 (26,8%)	0,25
Duración QRS (ms)	98,8 ± 26,4	110,0 ± 33,7	0,40
Alteraciones de la conducción (%)	5 (45,5%)	14 (34,1%)	0,49
Ondas T negativas (%)	3 (27,3%)	15 (36,6%)	0,56
Ecocardiograma			
DTDVI, mm	63,6 ± 13,7	70,7 ± 10,3	0,11
DTDVlp, %	139,3 ± 24,2	149,2 ± 17,6	0,20
FEVI, %	20,7 ± 8,4	21,5 ± 6,0	0,74
Afectación de VD, n (%)	5 (45,5%)	21 (51,2%)	0,44
Arritmias			
Arritmias ventriculares, n (%)	5 (45,5%)	18 (43,9%)	0,93
Arritmias auriculares, n (%)	1 (9,1%)	13 (31,7%)	0,13
Bloqueo aurículo-ventricular, n (%)	1 (9,1%)	10 (24,4%)	0,27
Curso clínico			
Arritmias ventriculares sostenidas o MSC, n (%)	4 (36,4%)	8 (19,5%)	0,25
TxC urgente (%)	5 (45,5%)	13 (31,7%)	0,40
Historia familiar			
MCD en la familia (%)	11 (100%)	40 (97,6%)	0,60
MSC en la familia (%)	4 (36,4%)	10 (24,4%)	0,43
Histopatología[†]			
Tejido graso en el VI, n (%)	1 (12,5%)	2 (9,1%)	0,78
Fibrosis en el VI, n (%),	3 (37,5%)	10 (45,4%)	0,68
Infiltración fibroadiposa <50% de la	1 (12,5%)	5 (22,7%)	0,83

pared del VI, n (%)			
Infiltración fibroadiposa $\geq 50\%$ de la pared del VI, n (%)	2 (25%)	5 (22,7%)	0,83
Tejido graso en el VD, n (%)	0 (0%)	4 (18,2%)	0,20
Fibrosis en el VD, n (%)	1 (12,5%)	8 (36,4%)	0,21
Infiltración fibroadiposa $< 50\%$ de la pared del VD, n (%)	1 (12,5%)	6 (27,3%)	0,42
Infiltración fibroadiposa $\geq 50\%$ de la pared del VD, n (%)	0 (0%)	2 (9,1%)	0,42
Infiltrado linfocitario, n (%)	0 (0%)	3 (13,6%)	0,27

* Mutaciones múltiples se refiere a MP+VSI o más de una MP en la clasificación final.

† Análisis histopatológico de los corazones explantados, disponible para 30 pacientes (8 con mutaciones múltiples y 22 sin mutaciones múltiples).

5.4 – BAG3

5.4.1 - Análisis clínico

En 4 pacientes de la cohorte se documentaron mutaciones patogénicas en el gen BAG3 (Pacientes #11, #12, #13 y #15). Todas ellas eran variantes no descritas que provocaban un truncamiento prematuro de la proteína. El paciente #11 presentaba además una VSI en el gen de la Actinina, y una variante no relacionada con MCD en PRKAG2. El estudio familiar (Apéndice 1, familias #11, #12, #13 y #15) documentó 14 sujetos adicionales que también eran portadores de las mutaciones. Sus características se muestran en la Tabla 15.

De los 18 portadores de mutaciones en este gen (edad media 46 ± 17 años, 12 varones), 11 (6%) presentaban MCD (48 ± 15 años, 8 varones) y 10 de ellos (91%) presentaban un fenotipo severo: 4 habían recibido un TxC, 1 estuvo en lista de espera, 8 tenían FEVI < 35% y 1 había muerto súbitamente a edad menor de 35 años. La edad media al diagnóstico de MCD entre los sujetos afectados era 38 ± 15 años y las edades de TxC fueron 16, 18, 45 y 64 años.

Un total de 5 (36%) sujetos (30 ± 7 años, 3 varones) eran portadores asintomáticos, aunque en todos ellos el estudio ecocardiográfico mostraba valores límite de función sistólica (FEVI media $53 \pm 0.8\%$) con diámetros diastólico VI (DDVI) en el límite superior de la normalidad (DDVI por Fórmula de Henry $110.7 \pm 6.7\%$). 2 pacientes no pudieron ser evaluados clínicamente.

Tres de los 8 pacientes con MCD (38%) presentaron arritmias ventriculares sostenidas. Sólo un paciente presentaba fibrilación auricular.

1 paciente portadora asintomática desarrolló MCD en el año siguiente al screening.

El análisis estadístico de estos grupos de pacientes demostró una expresividad edad-dependiente de la enfermedad (Tabla 16).

Tabla 15: Características de pacientes con mutaciones en BAG3

Características basales portadores		MCD (11)	
Edad media, años	46±17	Edad media, años	48 ± 15
Sexo, masc (%)	12 (67%)	Sexo, masc (%)	8 (73%)
MCD, n (%)	11 (61%)	FEVI media, %	25 ± 8%
		Fenotipo severo, n (%)	10 (91%)
		TxC	4
		Lista de espera	1
		FEVI<35%	8
		MS < 35 años	1
		Edad al D ^{co} , años	38 ± 15
		Edad al Tx, años	16, 18, 45, 64
		TVS/FV, n (%)	4 (36%)
		Fibrilación auricular, n (%)	1 (9%)

Portadores asintomáticos (5)	
Edad media, años	30 ± 7
Sexo, masc (%)	3 (60%)
FEVI media, %	53 ± 0,8%
DTDVI F.Henry, %	111 ± 7%

Tabla 16: Características diferenciales de portadores asintomáticos y afectados

	Asintomáticos	MCD	P
Sexo, masc	3 (60%)	8 (73%)	0,6
Edad media, años	30 ± 7	48 ± 15	0,03
Tipo mutación			
Arg121*	0	1	NS
Ala128GluFs*84	4	5	NS
Arg301Serfs*6	1	3	NS
Val439Glyfs*4	0	2	NS
Seguimiento medio, meses	6 ± 3	77±106	0,16

5.4.2 - Análisis histológico

Se evaluaron muestras histológicas mediante microscopía confocal de los pacientes #12, #13 y #15. No se realizó evaluación del paciente #11, por ser portador de otras dos variantes que podrían confundir los resultados.

El estudio confocal se comparó con pacientes wildtype (sin mutación) y pacientes con mutaciones en la Lamina y en la Titina (Figura 9).

En los pacientes con mutaciones en BAG3, se objetivó por un lado una importante desestructuración miofibrilar, y por otro la deslocalización de la proteína BAG3 de los discos Z sarcoméricos (Figuras 10 y 11).

Figura 9: Microscopía confocal en los 3 pacientes con mutaciones en LMNA y TTN

Muestras con marcaje fluorescente para la actinina (verde) y BAG3 (rojo). Wildtype se refiere a paciente con LMNA y TTN sin mutación. Las muestras pertenecen a los pacientes #23, #18 y #7.

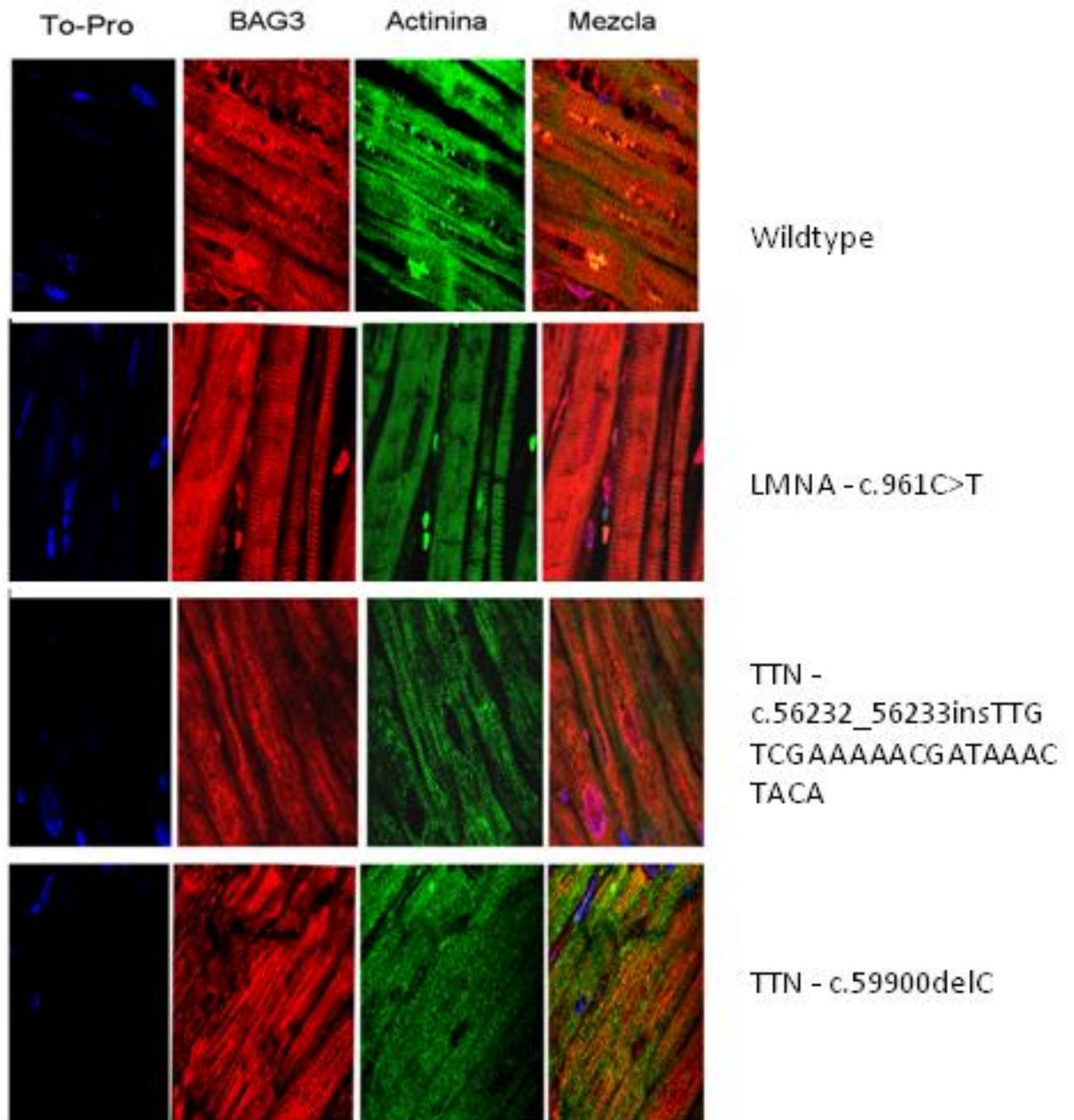


Figura 10: Microscopía confocal en los 3 pacientes con mutaciones en BAG3

Muestras con marcaje fluorescente para la actinina (verde) y BAG3 (rojo). Wildtype se refiere a paciente con BAG3 sin mutación. Las muestras pertenecen a los pacientes #13, #15 y #12.

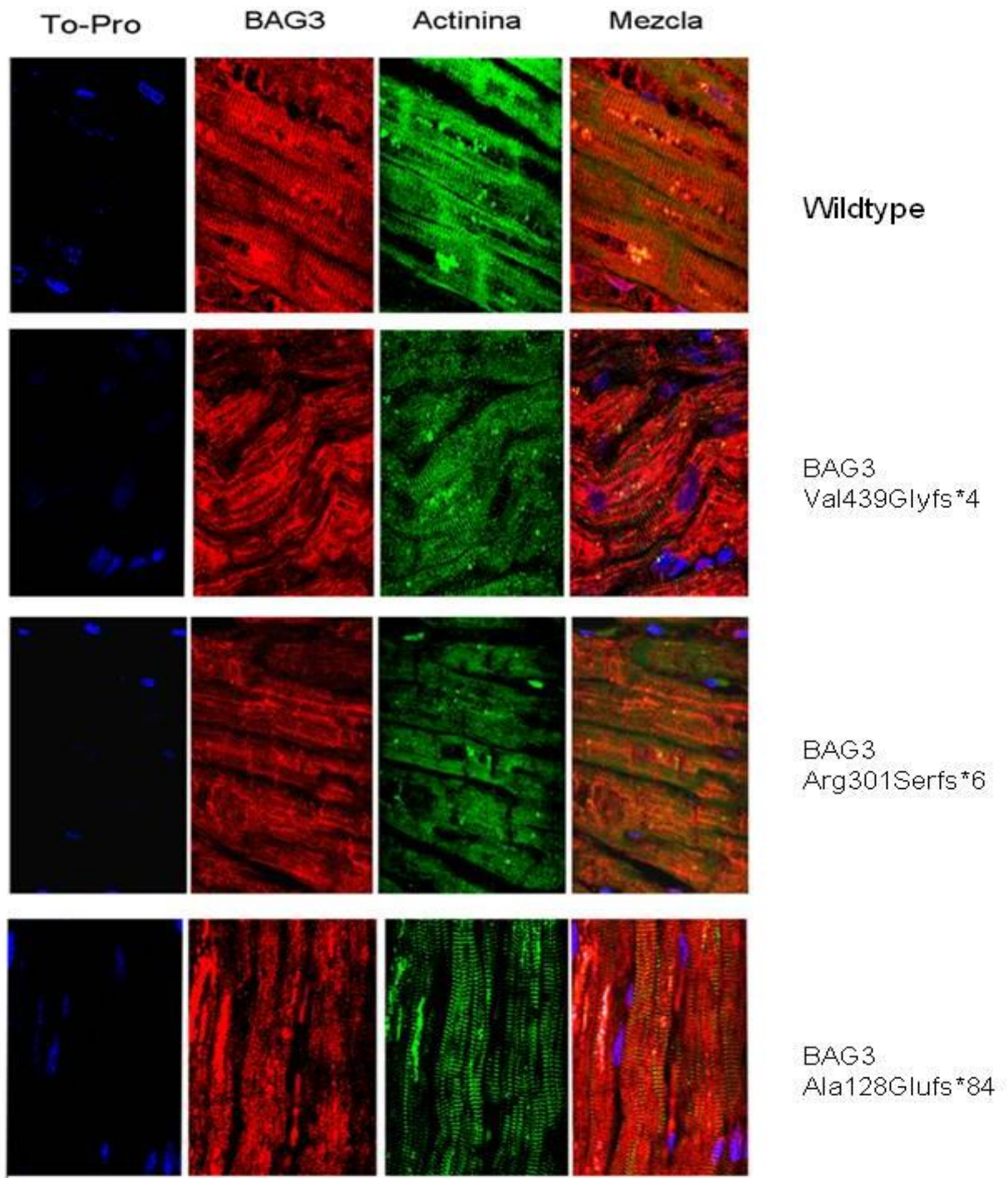
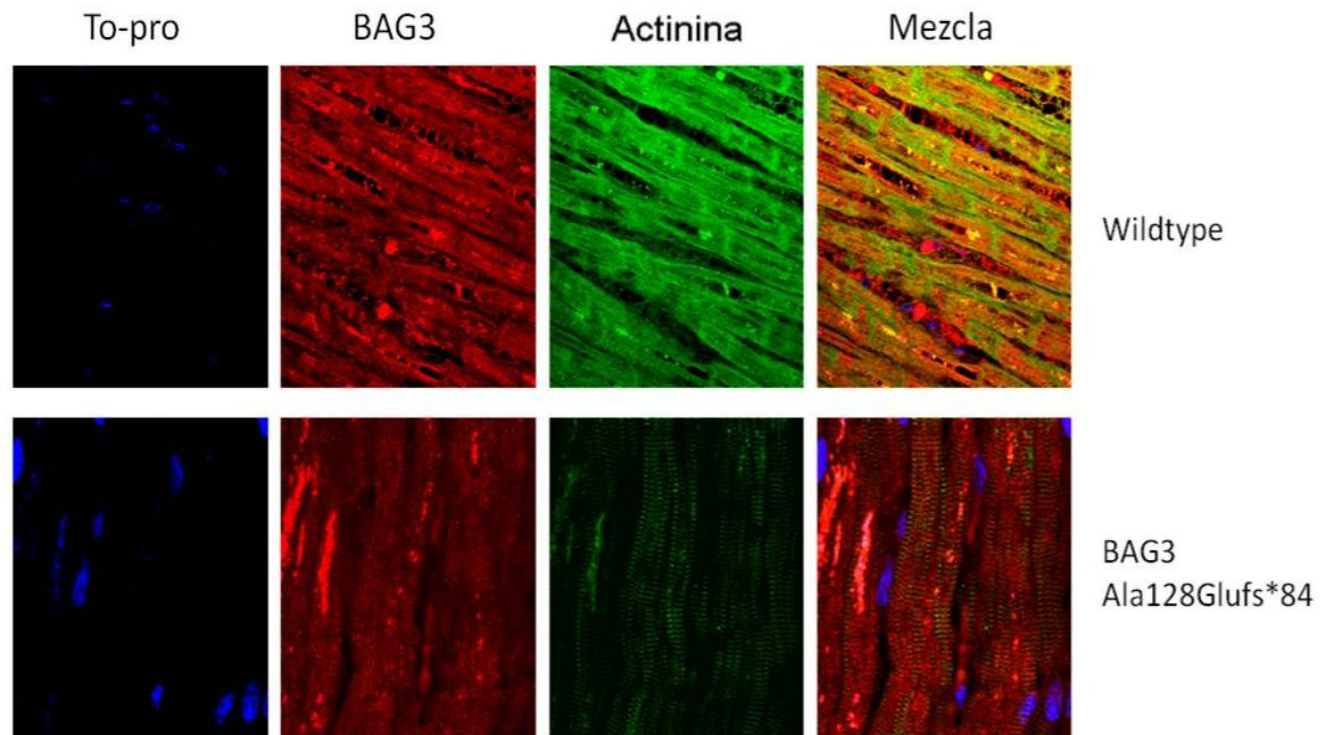


Figura 11: Microscopía confocal en el paciente #12 a alto aumento

Muestras con marcaje fluorescente para la actinina (verde) y BAG3 (rojo). Wildtype se refiere a paciente sin mutación.



6. DISCUSIÓN

Este estudio examina, por primera vez, la base genética de MCD familiar en individuos trasplantados de corazón. También es el primero en analizar el rendimiento de las nuevas tecnologías de análisis genético NGS más el estudio familiar detallado en esta entidad. Los resultados del estudio muestran que el espectro genético de los pacientes con MCD familiar que llegan al trasplante cardiaco, y por tanto presentan un fenotipo severo de la enfermedad, es heterogéneo y que la patogénesis de la enfermedad involucra varios genes. También revela que las actuales técnicas de NGS combinadas con la evaluación familiar detallada permiten la identificación de la mutación causante de la enfermedad hasta en un 73% de los individuos.

6.1 - Bases genéticas de la MCD familiar sometida a TxC

Aunque la base genética de la MCD se conoce desde hace más de 30 años y esta enfermedad es la principal causa de TxC en todo el mundo[8], hasta la fecha muy pocos estudios han examinado las características genéticas de los receptores de TxC por MCD[91, 92]. Los estudios genéticos realizados hasta la fecha se han restringido a grupos pequeños de pacientes, y han estudiado un número limitado de genes. En 2005, Karkkainen et al.[91] investigaron la prevalencia de mutaciones en el gen de la lamina A/C en 66 pacientes con TxC por MCD y encontraron mutaciones en 6 (9%) casos. Más tarde, nuestro grupo examinó 5 genes codificantes para proteínas desmosómicas en 89 pacientes trasplantados, encontrando MP en 13 de ellos (15%)[92]. En conjunto, ambos estudios sugerían que hay varios genes que podrían estar implicados en la patogénesis de la enfermedad y que algunos podrían predisponer a un curso clínico desfavorable; sin embargo, nunca se había explorado esto en detalle. Los resultados de este estudio ilustran la heterogeneidad genética de la MCD familiar que llega a TxC, como demuestra el hecho de que se hayan encontrado MP en más de 10 genes diferentes. No es sorprendente que el gen TTN, que codifica para la proteína más grande del organismo, haya sido uno de los principales genes en los que se han encontrado mutaciones.

Curiosamente, se han encontrado mutaciones causantes de enfermedad de forma recurrente en otros genes menos caracterizados, como BAG3 y FLNC. Basándonos en la heterogeneidad de los genes implicados en la enfermedad, podría recomendarse para su uso rutinario en la práctica clínica la utilización de amplios paneles de genes similares a los utilizados en este estudio, añadiendo otros genes recientemente asociadas a MCD, tales como NEBL[93] y DOLK[94].

6.2 - Efecto de mutaciones múltiples en MCD

Estudios previos han planteado la cuestión de si la evolución clínica adversa de la MCD podría estar relacionada con el efecto de mutaciones simultáneas en varios genes causales. Cuando se ha realizado un screening sistemático en los genes asociados a MCD en grandes cohortes de pacientes con MCD, se han descrito mutaciones potencialmente causales hasta en el 27% de los pacientes[57-60]. Sorprendentemente, hay escasa información hasta la fecha sobre la coexistencia de ≥ 2 mutaciones patogénicas en múltiples genes[57-60, 94]. La heterocigosis compuesta se ha descrito en pacientes con miocardiopatía arritmogénica y miocardiopatía hipertrófica, en los que la presencia de más de una mutación causa una enfermedad de inicio más precoz y de curso más severo[95, 96]. En nuestro estudio, 11 pacientes (21,2%) presentaban una combinación de dos MP (5,8%) o de una MP con una VSI (15,4%). Excluyendo los pacientes con la mutación fundadora en la Emerina, c.77T>C, la tasa de pacientes con múltiples variantes genéticas aumenta hasta un sorprendente 23,1%. Este porcentaje es mucho más alto que la tasa de múltiples mutaciones encontradas en pacientes con otras miocardiopatías hereditarias con evolución clínica desfavorable[96, 97]. En nuestro estudio, sin embargo, los pacientes con múltiples variantes genéticas no mostraron ningún hallazgo clínico o histológico específico (Tabla 14).

Se necesitan más estudios con datos genéticos robustos para confirmar si esta genética de daños múltiples determina el pronóstico de la MCD familiar. Si se confirmara, el estudio

genético rutinario con NGS podría ser de gran ayuda para predecir la evolución clínica de los pacientes con MCD.

6.3 - Rendimiento del análisis genético por NGS e importancia de la evaluación familiar

En las últimas dos décadas, se han asociado a MCD mutaciones en más de 50 genes[46, 48, 98]. A pesar de estos avances, la realización de estudios genéticos en la práctica clínica diaria se ha visto limitada por el bajo rendimiento de los test genéticos hasta ahora empleados.

En este estudio, hemos utilizado la tecnología NGS para lograr una mejor comprensión de las bases genéticas de la MCD familiar y para evaluar el rendimiento de los estudios NGS en este entorno. Utilizando estas técnicas, hemos logrado analizar de forma simultánea 59 genes relacionados con MCD, y hemos podido determinar la mutación causal en el 40% de nuestros pacientes, considerando únicamente los datos de NGS. Posteriormente, tras realizar minuciosos estudios de evaluación familiar, pudimos identificar la mutación causal en el 73% de los pacientes, poniendo en relieve el papel fundamental de los estudios de cosegregación familiar en esta enfermedad.

Los estudios genéticos previos realizados hasta la fecha que analizaban una media de 6 a 12 genes mediante secuenciación Sanger, revelaron un rendimiento de las pruebas genéticas que iba del 17% al 27% y alrededor del 25% si se consideraban sólo los casos de MCD familiar[56-60]. Algunos de estos estudios incluían estudio familiar y, por tanto, nuestros resultados reflejan un aumento sustancial en el rendimiento obtenido por técnicas de NGS.

Por otra parte, las técnicas de NGS también tienen el inconveniente de poder identificar variantes genéticas de significado incierto en genes tanto relacionados como aparentemente no relacionados con la enfermedad en estudio, precisando realizar análisis ulteriores para intentar determinar su significación[66, 67, 99, 100]. En nuestro estudio, se encontraron variantes genéticas relevantes en genes relacionados con otras enfermedades cardiovasculares en el 25% de nuestros pacientes. Algunas de estas variantes eran de hecho

mutaciones causales de patología por sí mismas (Tabla 12). El estudio de Hass et al.[101] publicado en el EHJ en 2014, comunicó un número significativo de mutaciones en genes como PKP2 y TTN, genes que presentan un alto número de estas variantes genéticas difíciles de clasificar[102]. En este estudio, hemos sido muy cautelosos en la clasificación de la MP y VSI, y la forma más definitiva para confirmar o descartar la patogenicidad de las variantes ha sido la evaluación familiar. En algunos estudios publicados con anterioridad, se ha considerado un estudio de cosegregación positivo con un bajo número de familiares afectados, algo que podría ser objeto de crítica. En nuestro estudio, 16 de los 17 individuos con VSI reclasificados como MP mostraron cosegregación positiva con un número significativo de familiares afectados (≥ 5 en todos los casos).

La definición de VSI que hemos utilizado también ha sido especialmente restrictiva, al clasificar como VSI mutaciones missense previamente descritas como patogénicas, pero que habían sido determinadas en bases poblacionales de gente sana. Tras completar la evaluación familiar, 5 de las 17 variantes clasificadas como VSI presentaban una frecuencia de alelo menor (MAF) $>1\%$, a pesar de haber sido previamente descritas como causantes de MCD en la literatura (Tabla 11). Dada su frecuencia de alelo menor, es poco probable que puedan causar MCD por sí mismas, pero no puede descartarse por completo que cumplan un papel modificador en presencia de otras mutaciones más agresivas.

En el futuro, serán necesarios estudios genéticos ampliados, con una evaluación fenotípica y familiar minuciosa, para ayudar a clasificar las variantes genéticas de significado incierto, pero es de esperar que este tema siga siendo uno de los principales retos en el campo de la MCD, puesto que la mayoría de las mutaciones aparecen solamente a una o unas pocas familias, y a menudo no existen estudios funcionales de las mutaciones concretas. Estudios como el nuestro será de utilidad en la práctica clínica diaria para ayudar a determinar la patogenicidad de las mutaciones.

6.4 - Implicaciones clínicas

El hecho de que aproximadamente el 20-25% de los pacientes con TxC tengan pruebas directas de enfermedad familiar ilustra la importancia de proporcionar asesoramiento genético y evaluación clínica inmediata a los familiares de pacientes con MCD en fase terminal. Como se muestra en este estudio, las nuevas técnicas de estudio genético más la evaluación familiar detallada tienen un fuerte potencial para identificar la mutación causal en la MCD familiar en estadio avanzado. El rendimiento genético observado es mayor que el descrito para otras enfermedades hereditarias, tales como la miocardiopatía hipertrófica, en la que el estudio genético tiene en las guías de práctica clínica una recomendación de clase I[62]. La incorporación del estudio genético a la práctica clínica habitual requiere un cambio de paradigma en la mayoría de las unidades de insuficiencia cardíaca y trasplante, que implique un enfoque diferente para pacientes y familiares. En particular, debería ofrecerse siempre estudio genético a los pacientes sometidos a TxC por MCD, ya que éste podría tener un impacto en el manejo clínico de sus familiares y dando la posibilidad de proporcionar asesoramiento genético.

Por otro lado, ya que algunos estudios han demostrado diferencias en el curso clínico de la MCD basado en el defecto genético subyacente (con el ejemplo más claro de modificaciones en el manejo de acuerdo a la genética en el gen de la Lamina)[103-106], la realización de estudios genéticos adicionales en pacientes con MCD que llegan a TxC ayudarán a definir el curso clínico y la historia natural de esta enfermedad tan compleja.

En nuestro estudio, analizando las características diferenciales entre los pacientes en quienes se identificaron MP y los que no, se objetivó que los pacientes con MP presentaban menos dilatación de ventrículo izquierdo y mayor prevalencia de arritmias ventriculares y muerte súbita, pero menor historia familiar de muerte súbita (Tabla 13).

Evaluaciones clínico-histopatológicas como la realizada en los portadores de mutaciones tipo truncamiento en el gen BAG3 permiten comprender cada vez un poco mejor los diferentes

mecanismos por los cuales se desarrolla esta enfermedad, y realizar correlaciones entre la genética, la histología y el curso clínico. Probablemente estas diferencias y otras serían más manifiestas en estudios realizados con un mayor número de pacientes.

Por último, el hallazgo de una mutación fundadora en el gen de la Emerina en población de Tenerife, con alta prevalencia entre los pacientes que llegan a TxC por MCD (13 de los 14 pacientes provenientes de este área geográfica tenían esta mutación como causa de la enfermedad) ha impulsado la creación de un test genético rápido para determinar esta variante, permitiendo un ahorro en costes y una mayor celeridad para el diagnóstico genético de la que se podrán beneficiar pacientes y familiares provenientes de esta región.

6.5 - Limitaciones

Nuestra cohorte se compone predominantemente de varones (92%). Los receptores de trasplante cardíaco en España son principalmente varones (80% de los receptores de TxC entre 1984 y 2013)[107]. Dado que nuestro estudio se centra en los receptores de TxC, esto podría haber causado un sesgo. Por el contrario, estos resultados también pueden ser consecuencia de la expresividad sexo-dependiente de la MCD por causa genética. Sería interesante investigar el efecto del género sobre la expresión de la enfermedad en futuros estudios.

Los resultados obtenidos también pueden estar influenciados por el hecho de que 13 pacientes aparentemente no relacionadas compartían una mutación fundadora en la Emerina. Si esas familias hubieran sido consideradas como una sola, el rendimiento genético de NGS más estudio familiar habría disminuido a un 50%.

CONCLUSIONES

1. El espectro genético de la MCD familiar sometida a trasplante cardiaco es heterogéneo e involucra múltiples genes.
2. La tecnología NGS más la evaluación familiar detallada permiten la identificación de la mutación causal en la mayoría de los casos de MCD familiar.
3. Para determinar la patogenicidad de las variantes genéticas encontradas, es fundamental la interpretación cuidadosa de los resultados genéticos y la realización de un estudio familiar exhaustivo.
4. Las características clínicas de los pacientes con MCD familiar que requieren un trasplante cardiaco incluyen: mayor prevalencia de varones, edades en torno a los 40 años, moderada prevalencia de fibrilación auricular, alta prevalencia de arritmias ventriculares, alta prevalencia de afectación biventricular, curso predominantemente crónico y antecedentes de muerte súbita familiar en un porcentaje elevado.
5. El porcentaje de pacientes con mutaciones múltiples es mayor que el descrito en otras miocardiopatías con evolución clínica desfavorable. Sin embargo, estos pacientes no mostraron ningún hallazgo clínico o histológico específico.
6. Las mutaciones en BAG3 aparecen en alrededor del 7% de pacientes trasplante cardiaco por MCD familiar. Las mutaciones documentadas conllevan una disrupción proteica con deslocalización proteica. La MCD secundaria a mutaciones en el gen BAG3 se caracteriza por alta penetrancia y expresividad edad-dependiente.

7. Los pacientes varones con MCD que precisan trasplante cardiaco provenientes de la isla de Tenerife tienen alta prevalencia de una mutación fundadora en el gen de la Emerina. Esta mutación se caracteriza por ausencia de fenotipo muscular, alta penetrancia y extensa historia familiar de muerte súbita y necesidad de trasplante cardiaco.

RESUMEN

Antecedentes

La miocardiopatía dilatada idiopática (MCD), caracterizada por la dilatación y disfunción sistólica del ventrículo izquierdo, en ausencia de condiciones de carga anormales, enfermedad coronaria o valvulopatías, es la causa más común de insuficiencia cardíaca en jóvenes y la indicación más frecuente para trasplante cardíaco (TxC). Los estudios familiares realizados hasta la fecha sugieren que hasta un 20-50% de los pacientes con MCD tienen una predisposición familiar para desarrollar la enfermedad. Sin embargo, la base genética de esta enfermedad es aún desconocida en la mayoría de los pacientes, en especial en aquellos con enfermedad avanzada, en los que existen muy pocos estudios genéticos.

Hasta ahora se han asociado con MCD familiar más de 50 genes, sin embargo, la contribución exacta de las diferentes mutaciones al desarrollo de esta patología es aún desconocida. El gran número de genes relacionados con la MCD familiar ha dificultado el estudio de sus bases genéticas hasta la fecha y ha limitado la aplicación de estrategias de screening genético en la práctica clínica habitual.

Recientemente, se han producido importantes avances en el campo de la genómica con la aparición de las técnicas de secuenciación de nueva generación (Next Generation Sequencing, NGS), que permiten el estudio de un gran número de genes simultáneamente en un corto período de tiempo y con un coste relativamente bajo.

Aunque las técnicas de estudio genético por NGS serán pronto parte rutinaria de la práctica clínica, y de hecho ya lo son en algunos centros, hasta la fecha no hay estudios importantes con evaluación familiar completa que hayan proporcionado datos sólidos sobre el rendimiento de la evaluación genética mediante estas técnicas en el estudio de la MCD.

Objetivos

Determinar la prevalencia de mutaciones en genes asociados a MCD en una cohorte de pacientes trasplantados por miocardiopatía dilatada familiar. Confirmar mediante parámetros fisicoquímicos, filogenéticos y estudios familiares exhaustivos la patogenicidad de las mutaciones encontradas. Estudiar las características fenotípicas de los pacientes con MCD que requieren trasplante, con intención de establecer en base a ellas correlaciones fenotipo-genotipo de utilidad para la práctica clínica. Analizar y determinar si existen características clínicas y anatomopatológicas especiales en pacientes con MCD familiar que presentan mutación causal de la enfermedad, y en aquellos que presentan dobles mutaciones. Evaluar mediante análisis anatomopatológico convencional (tinciones convencionales y microscopía óptica) y avanzado (inmunofluorescencia y microscopía confocal) las características histológicas de la MCD secundaria a mutaciones en genes de especial interés. Determinar la utilidad de las nuevas técnicas de secuenciación (Next Generation Sequencing) para el estudio de familias afectadas por MCD.

Métodos

Se incluyeron 52 pacientes no relacionados, trasplantados cardiacos debido a MCD familiar en 3 centros de trasplante cardiaco en España. Se realizó estudio mediante NGS de 126 genes relacionados con patologías hereditarias cardiovasculares, 59 de ellos específicamente relacionados con MCD. Las variantes encontradas se definieron como mutaciones patogénicas (MP) si se localizaban en un gen asociado a MCD, no aparecían en controles y se habían descrito como patogénicas, o si se trataba de nuevas variantes en un gen asociado a MCD, no encontradas en controles y producían un cambio que predecía un truncamiento prematuro, desplazamiento del marco de lectura o un splicing anormal de la proteína. Por el contrario, las variantes se clasificaron como variantes de significado incierto (VSI) si eran nuevas variantes missense en un gen asociado a MCD y no encontradas en controles, o si eran variantes

descritas anteriormente como patogénicas en bases de datos internacionales, pero habían sido asimismo encontradas en controles. Posteriormente se llevaron a cabo estudios familiares y de cosegregación, reclasificando las VSI según estos resultados.

Se realizó asimismo un estudio anatomopatológico de los corazones explantados.

En determinados individuos, en base a sus resultados genéticos, se realizó un estudio de microscopía confocal (BAG3) y un estudio de haplotipos (EMD).

Resultados

Se incluyeron 52 pacientes (edad media $40,1 \pm 14,4$ años; 92% varones). 51 pacientes (98%) presentaban antecedentes familiares de MCD y 20 (38%) de MSC. Inicialmente se detectaron 24 mutaciones patogénicas (MP) en 21 pacientes (40%). Tres de ellos albergaban 2 MP en diferentes genes y 6 presentaban también variantes de significado incierto (VSI). Un total de 25 pacientes (48%) presentaban 19 VSI (12 variantes missense no descritas y no encontradas en controles y 7 variantes asociadas a MCD pero descritas también en controles). Por último, 6 pacientes (12%) no mostraban variantes en genes relacionados con MCD.

La evaluación familiar consistió en el estudio clínico y genético de 220 familiares de 36 de las 46 familias con variantes (78%). El estudio familiar permitió confirmar la patogenicidad de 14 MP, y reclasificar las VSI como MP en 17 familias y como no patogénicas en 3 casos. La evaluación familiar no fue posible en 3 pacientes con VSI y no fue concluyente en 2 pacientes.

Entre las 17 familias con VSI que fueron reclasificados como MP, 13 presentaban la misma mutación en el gen EMD (c.77T> C). Eran varones aparentemente no relacionados, sin fenotipo muscular, procedentes de la misma zona geográfica (isla de Tenerife). Un estudio de haplotipos en 9 pacientes con esta mutación confirmó un haplotipo compartido, describiéndose por tanto una mutación fundadora.

En 4 pacientes se determinaron variantes tipo truncamiento no previamente descritas en el gen BAG3. El estudio histológico en 3 de estos pacientes demostró disrupción y delocalización

proteica. El estudio familiar de portadores sanos y afectados objetivó que estas mutaciones presentaban alta penetrancia y una expresividad edad-dependiente.

Al final del estudio, se identificó la mutación causal de la enfermedad en 38 pacientes (73%). Los genes mutados incluían: EMD (13 pacientes), TTN (10), BAG3 (4), LMNA (3), FLNC (2), TNNT2 (2), DMD, DSC2, DSP, MYH7, PKP2, ABCC9 y TPM1. Un total de 5 pacientes (10%) presentaban únicamente VSI en los siguientes genes: PSEN2 (2), DSC2, DSG2, MYBPC3, MYH6, MYPN y TNNC1. Por último, en 9 casos (17%) no se identificó ninguna variante.

Conclusiones

El espectro genético de la MCD familiar sometida a trasplante cardiaco es heterogéneo e involucra múltiples genes. La tecnología NGS más la evaluación familiar detallada permite la identificación de la mutación causal en la mayoría de los casos de MCD familiar (73% en este estudio). El estudio genético mediante NGS en pacientes con MCD familiar que llegan a trasplante tiene alto rendimiento, y debería ofrecerse siempre a pacientes con estadios terminales de MCD familiar. Para determinar la patogenicidad de las variantes genéticas encontradas, es fundamental la interpretación cuidadosa de los resultados genéticos y la realización de un estudio familiar exhaustivo.

Las características clínicas de los pacientes con MCD que requieren un trasplante cardiaco incluyen: mayor prevalencia de varones, edades en torno a los 40 años, moderada prevalencia de fibrilación auricular, alta prevalencia de arritmias ventriculares, alta prevalencia de afectación biventricular, curso predominantemente crónico y antecedentes de muerte súbita familiar en un porcentaje elevado. El porcentaje de pacientes con mutaciones múltiples es mayor que el descrito en otras miocardiopatías con evolución clínica desfavorable; sin embargo, los pacientes con mutaciones múltiples no mostraron ningún hallazgo clínico o histológico específico.

Las mutaciones en BAG3 aparecen en alrededor del 7% de pacientes trasplante cardiaco por MCD familiar. Las mutaciones en este gen conllevan una disrupción proteica con deslocalización de la proteína a nivel celular. La MCD secundaria a mutaciones en el gen BAG3 se caracteriza por alta penetrancia y expresividad edad-dependiente.

Los pacientes varones con MCD que precisan trasplante cardiaco provenientes de la isla de Tenerife tienen alta prevalencia de una mutación fundadora en el gen de la Emerina (c.77T>C). Esta mutación se caracteriza por ausencia de fenotipo muscular, alta penetrancia y extensa historia familiar de muerte súbita y necesidad de trasplante cardiaco.

El seguimiento clínico y las implicaciones respecto a consejo profesional y reproductivo de los familiares de pacientes con MCD varían en función de si portan el defecto genético del caso índice. La incorporación de los análisis genéticos a la práctica clínica diaria es factible, y requiere un enfoque global en el estudio de pacientes y familiares en las unidades de insuficiencia cardiaca y trasplante.

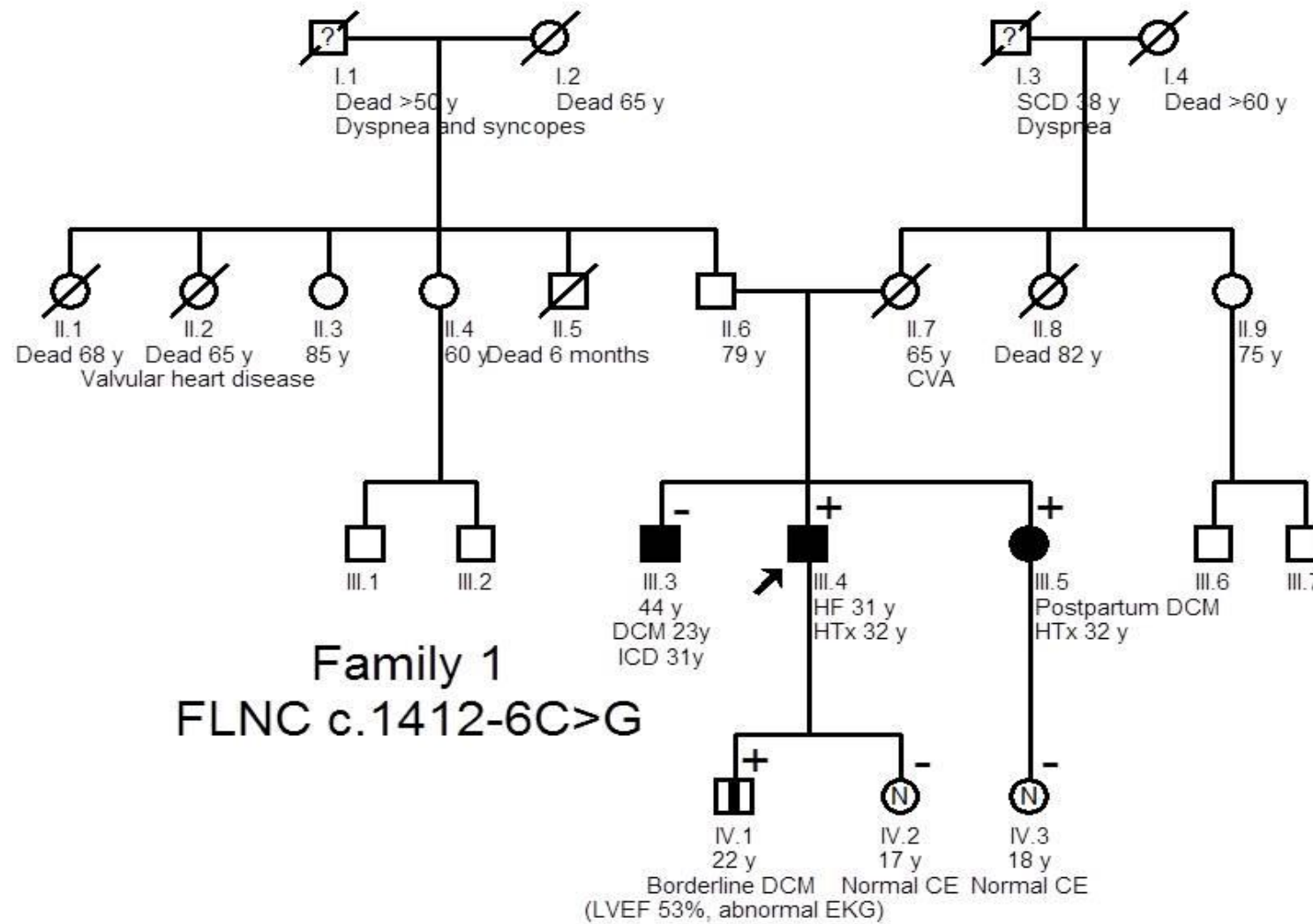
APÉNDICES

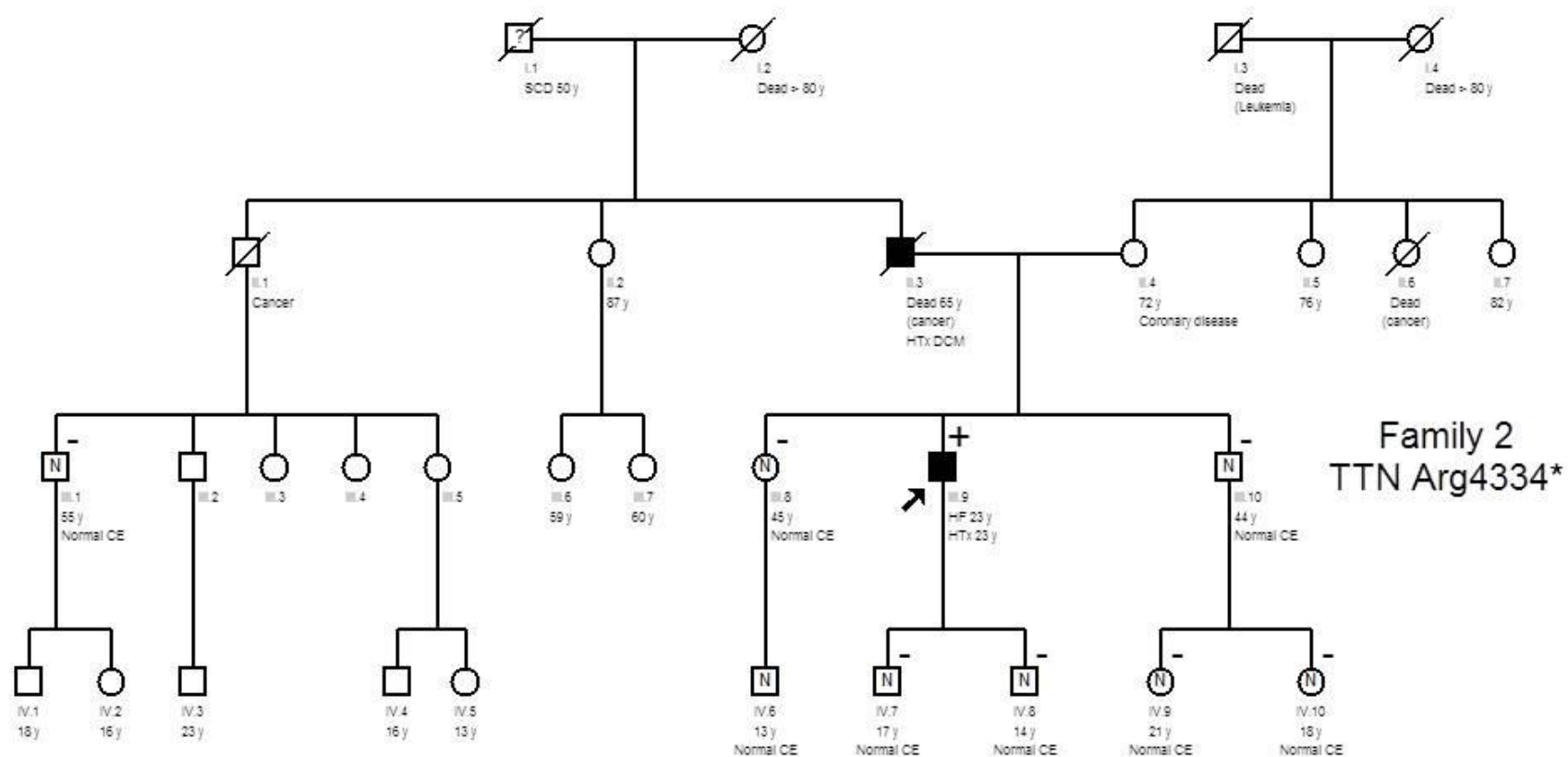
Apéndice 1: Árboles familiares de los pacientes con trasplante cardíaco por MCD incluidos en el estudio.

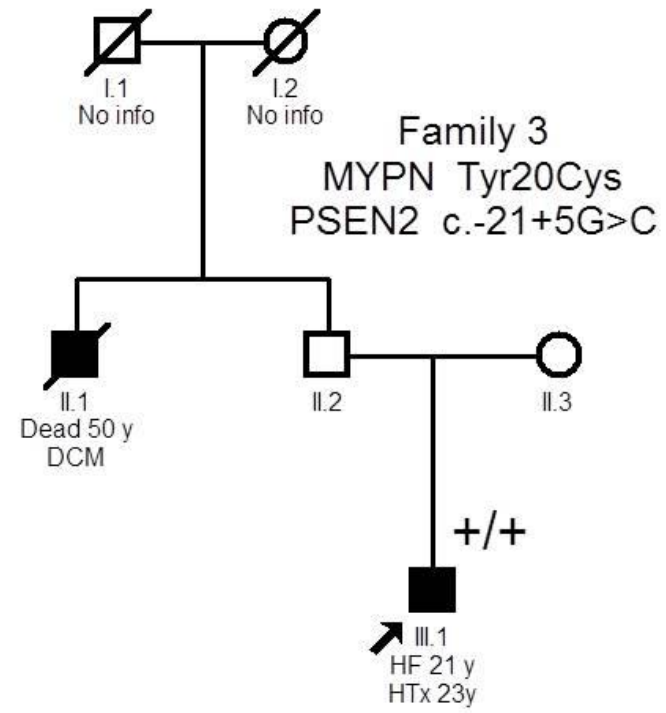
Los cuadrados y los círculos indican sujetos masculinos y femeninos, respectivamente. Los símbolos rellenos son los individuos afectados. Los símbolos semisólidos son individuos con afectación borderline. Los símbolos que contiene un punto son portadores no afectados. Los símbolos que contienen una "N" son los no portadores no afectados. Los símbolos con una barra oblícua indican los familiares fallecidos. Las flechas indican los probandos. Las relaciones que ya no existen se indican con una marca oblícua sobre las líneas horizontales. La consanguinidad se indica mediante líneas horizontales dobles. Las edades indicadas se refieren a la edad en el momento de la muerte de los familiares fallecidos y edad actual en los familiares vivos.

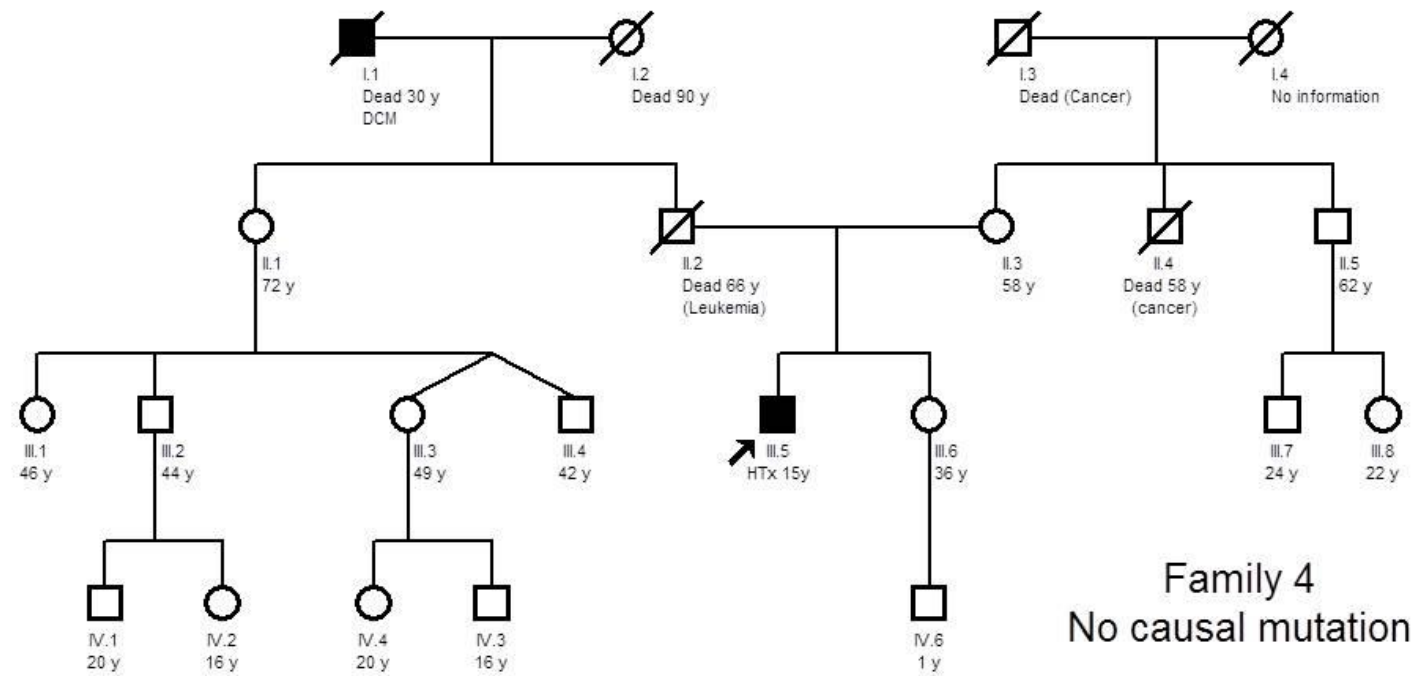
HTx indica trasplante de corazón; y, años; CE, evaluación clínica (incluyendo ECG y ecocardiograma);

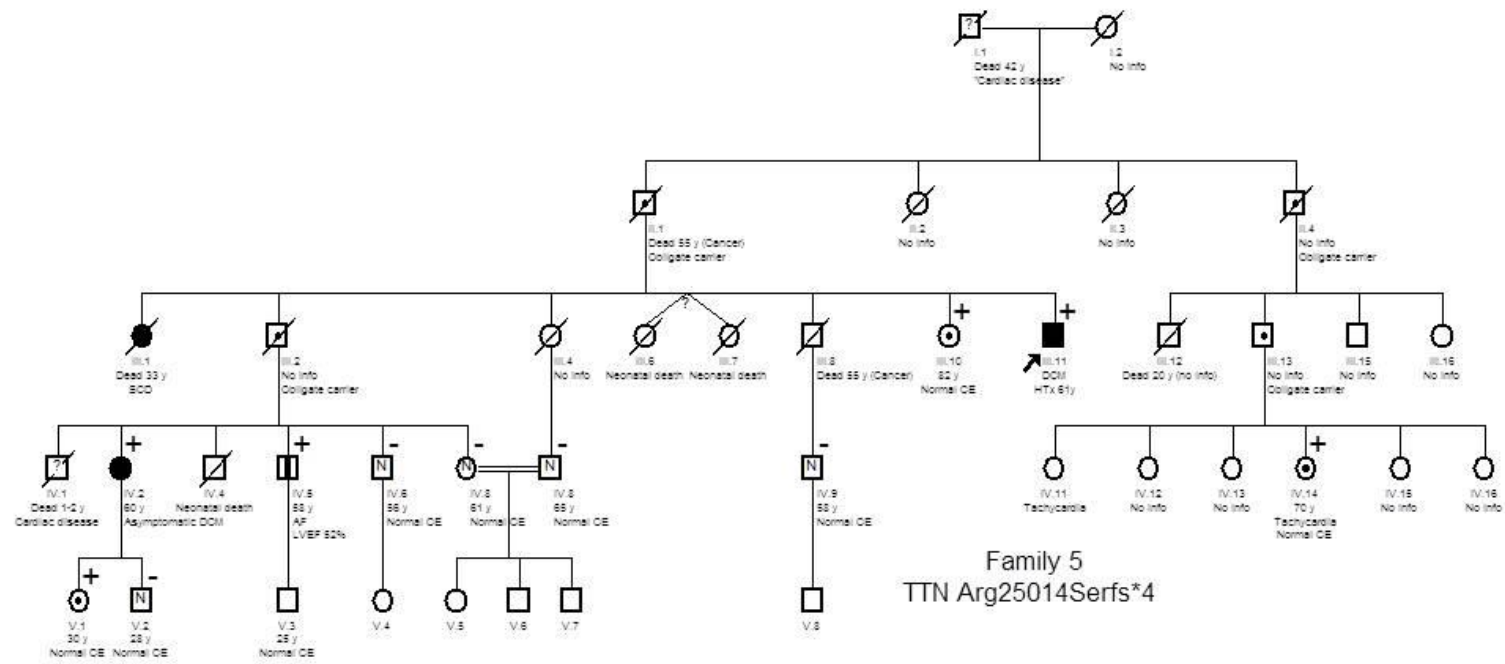
SCD, muerte súbita cardíaca; ICD, desfibrilador automático implantable; HF, insuficiencia cardíaca; IAM, infarto agudo de miocardio; CAD, enfermedad coronaria, ACV, accidente cerebrovascular.

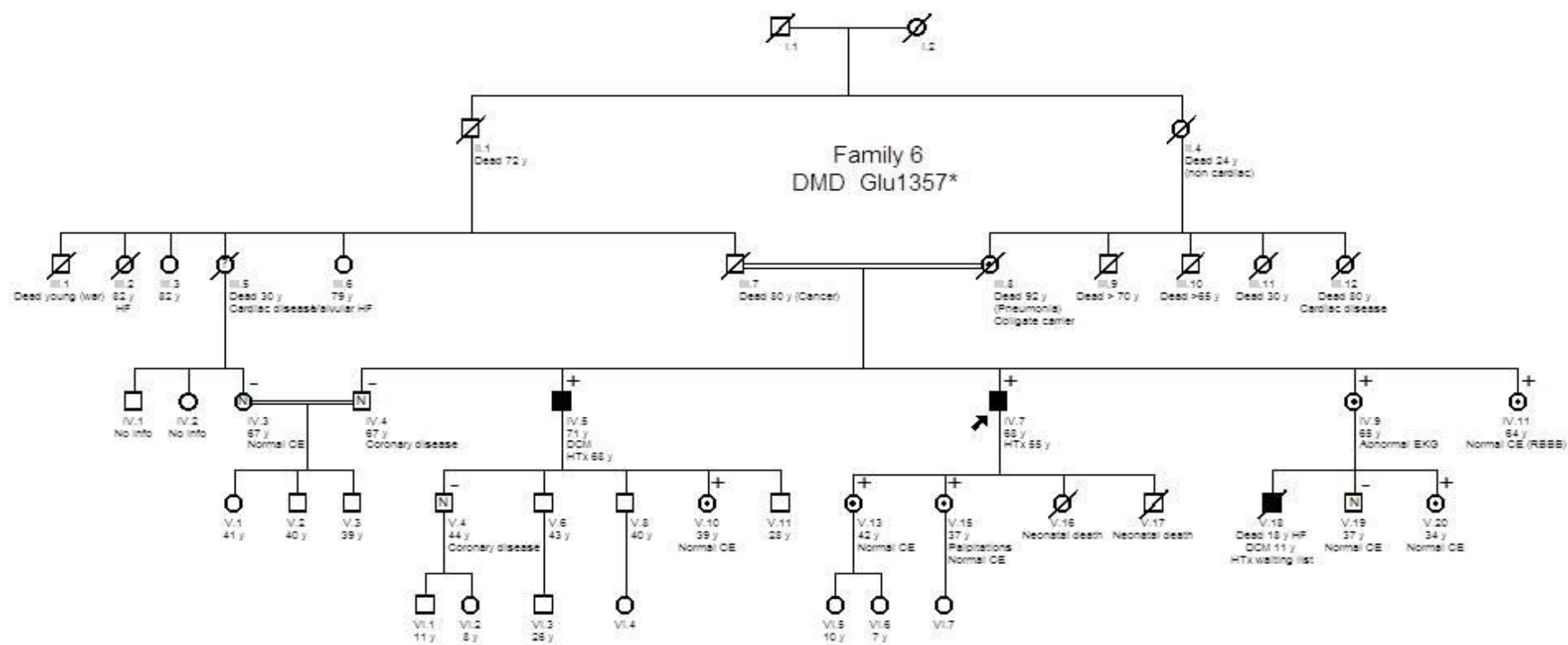


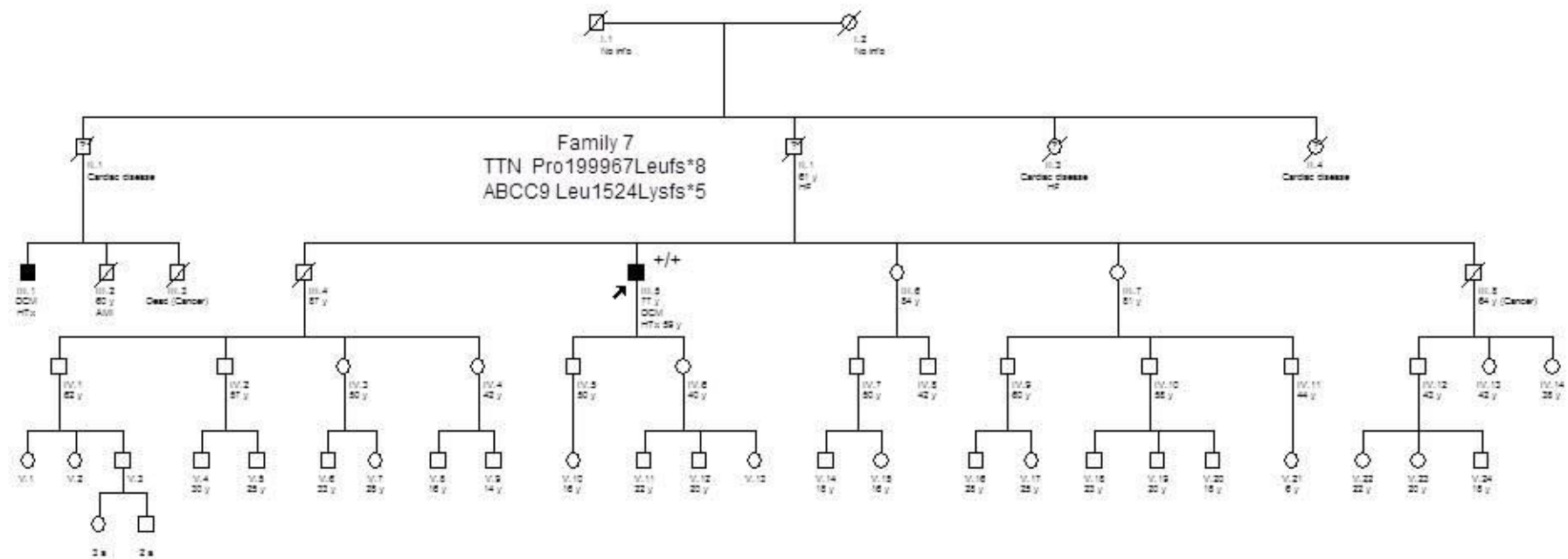


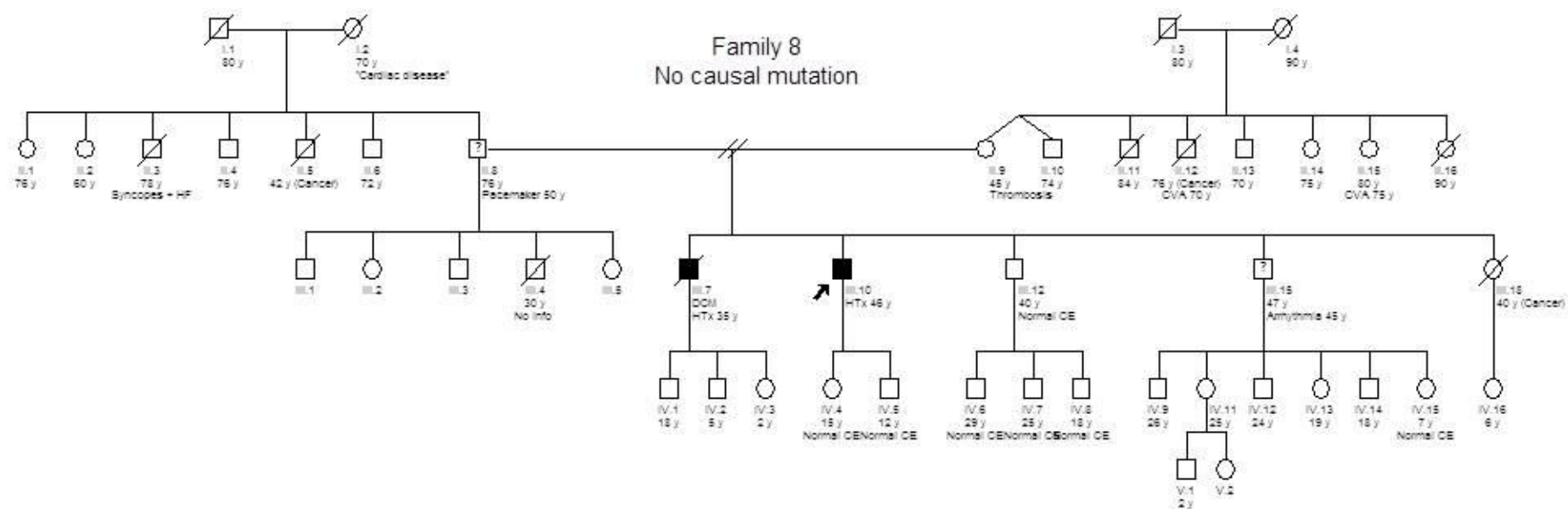


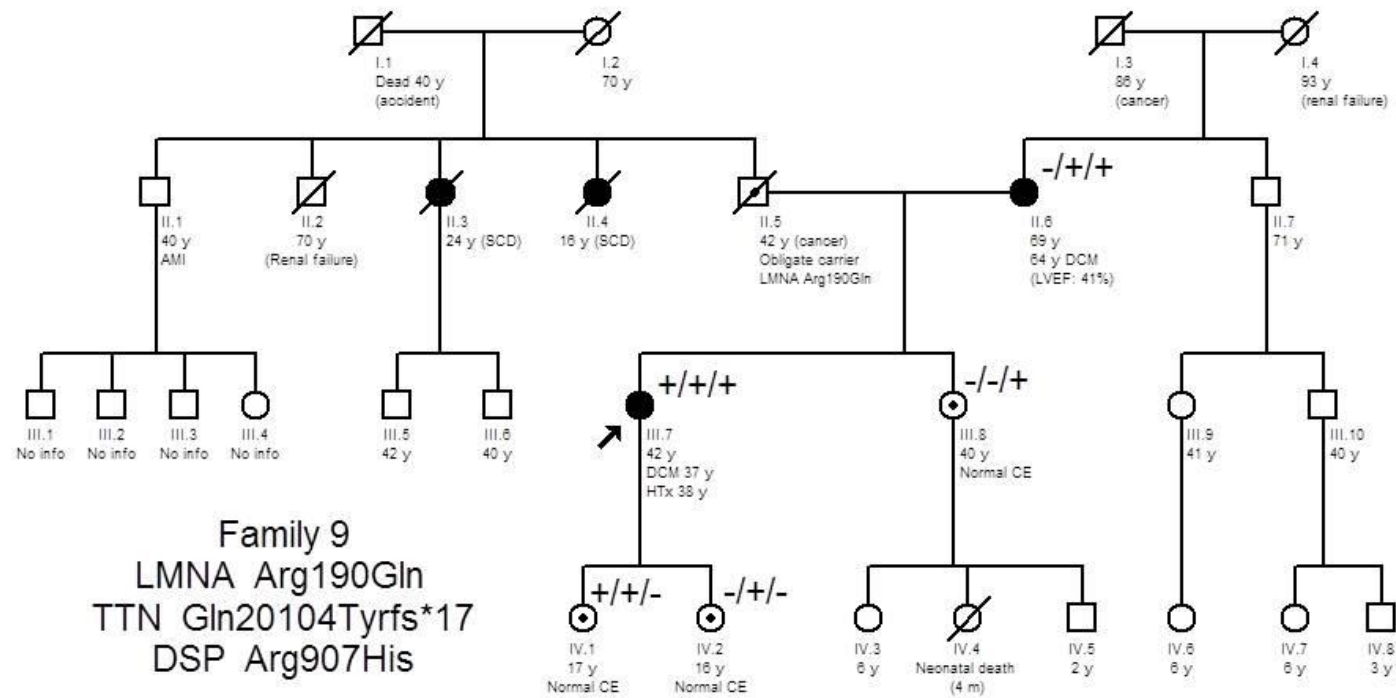


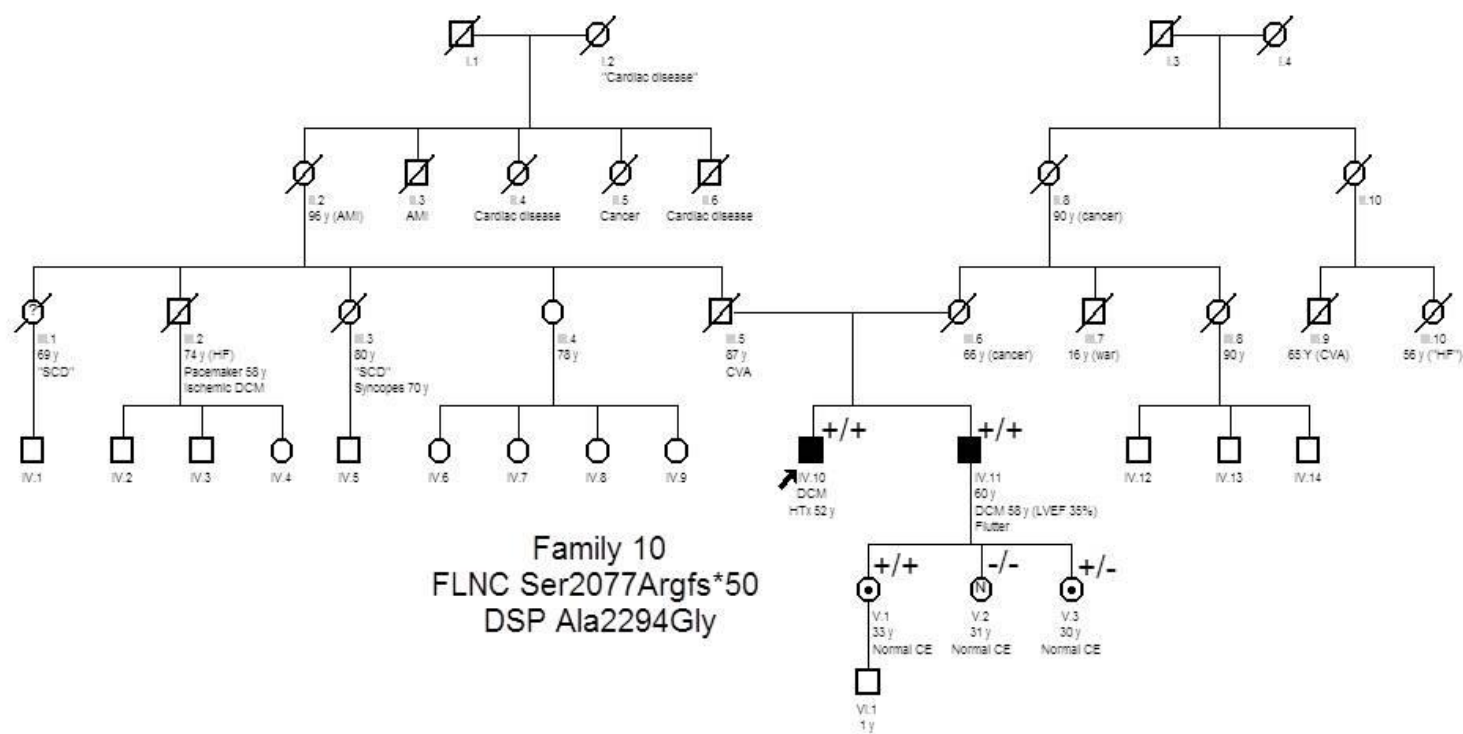


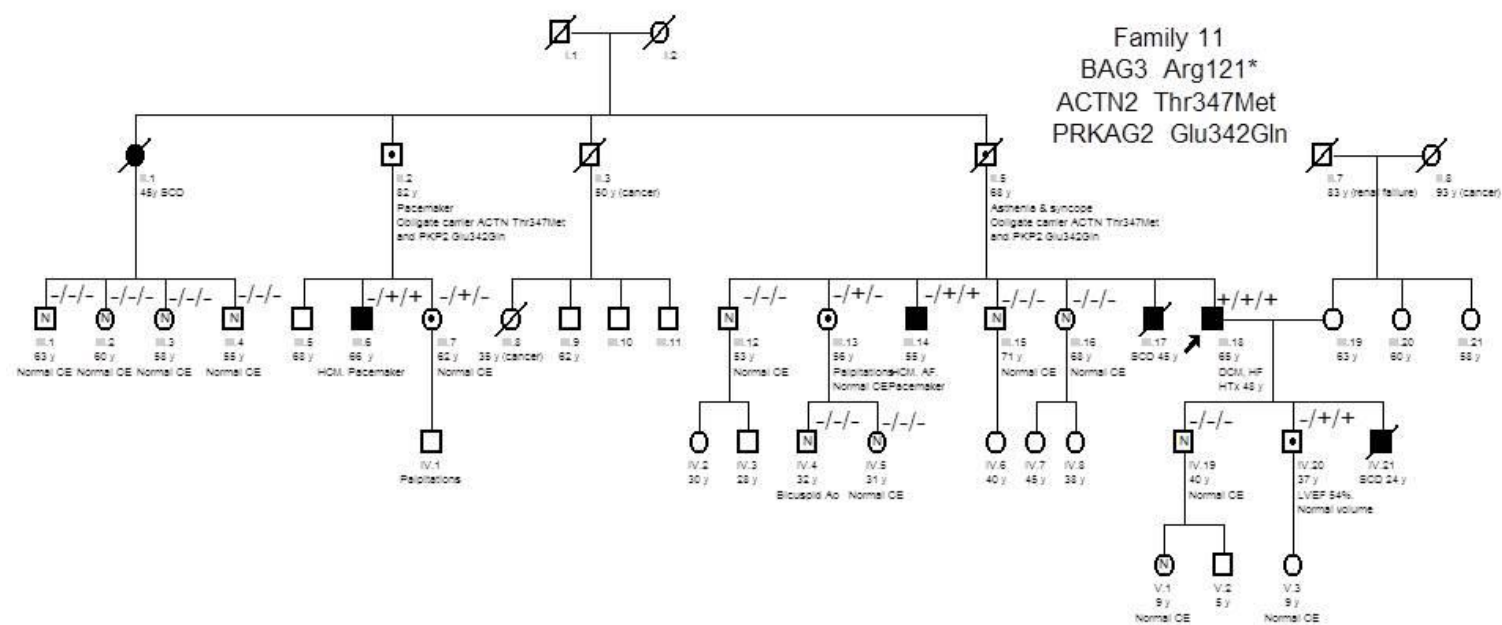


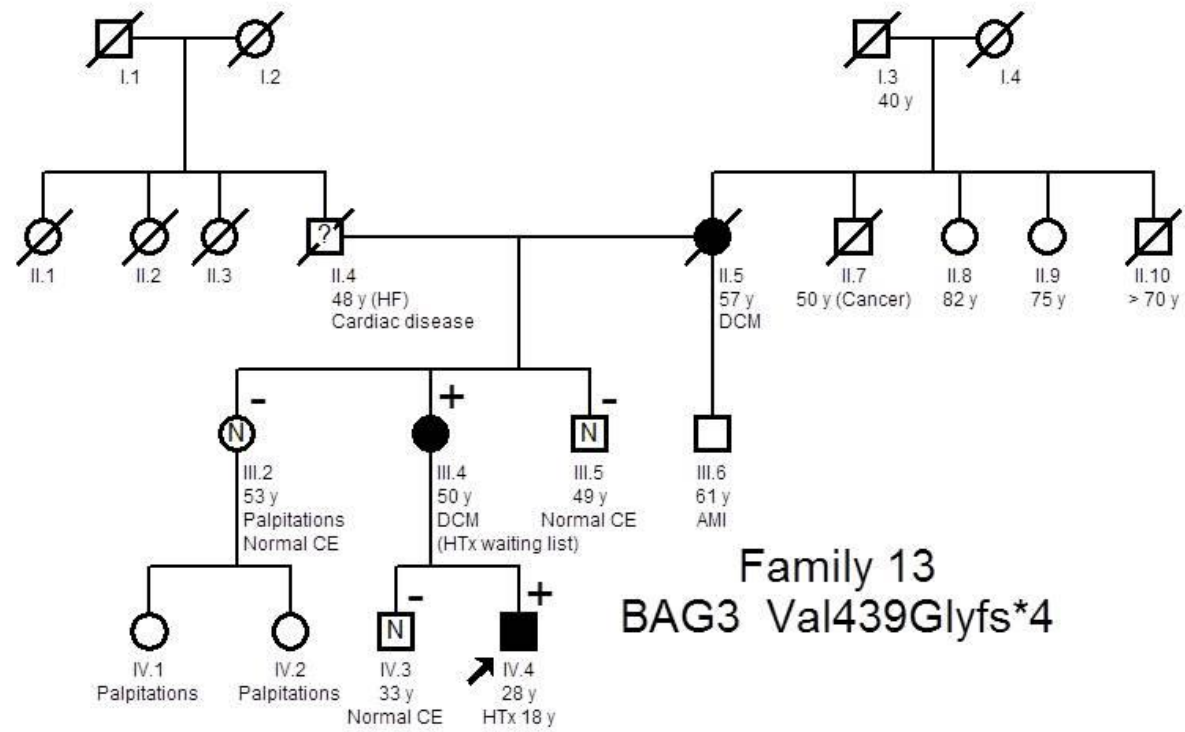


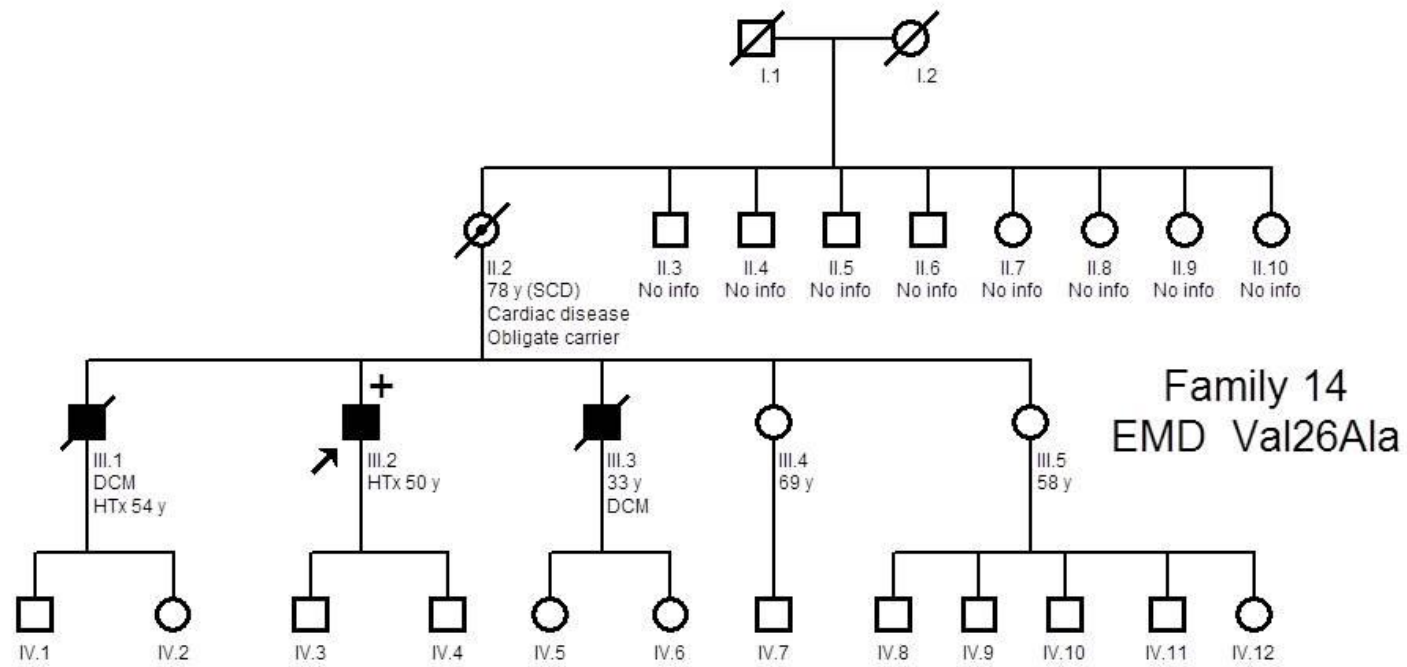


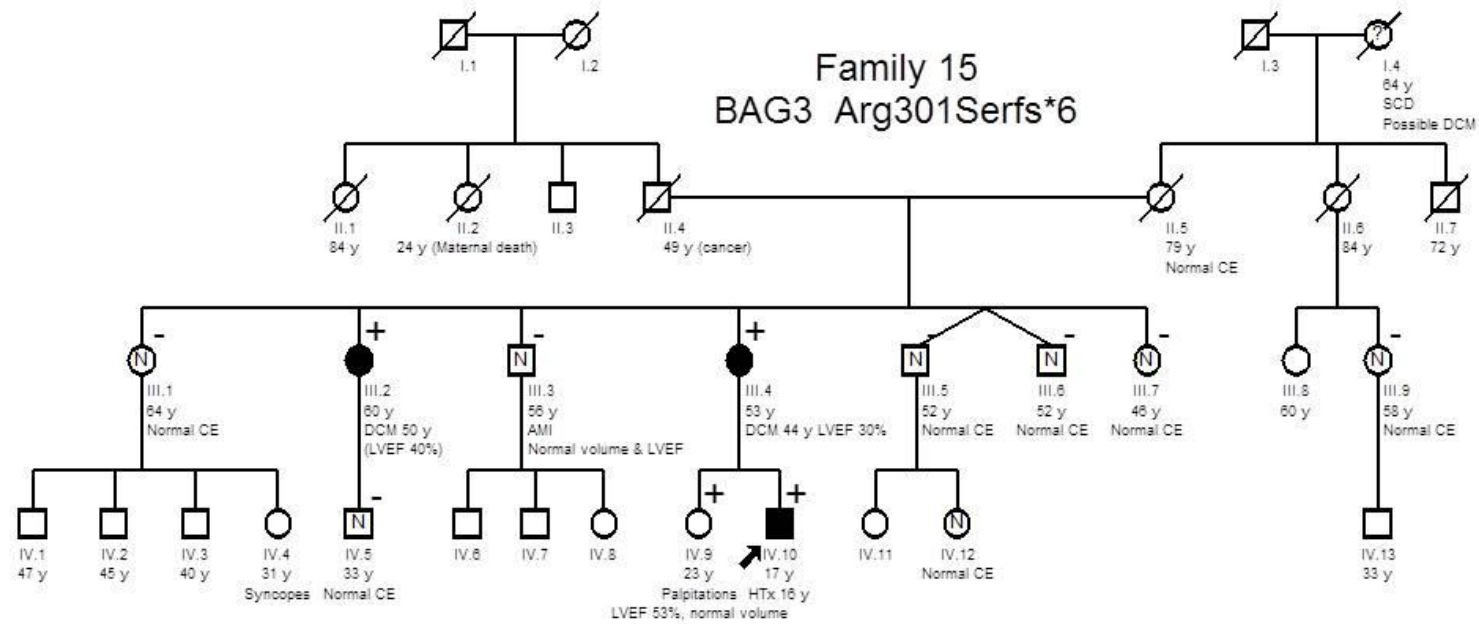


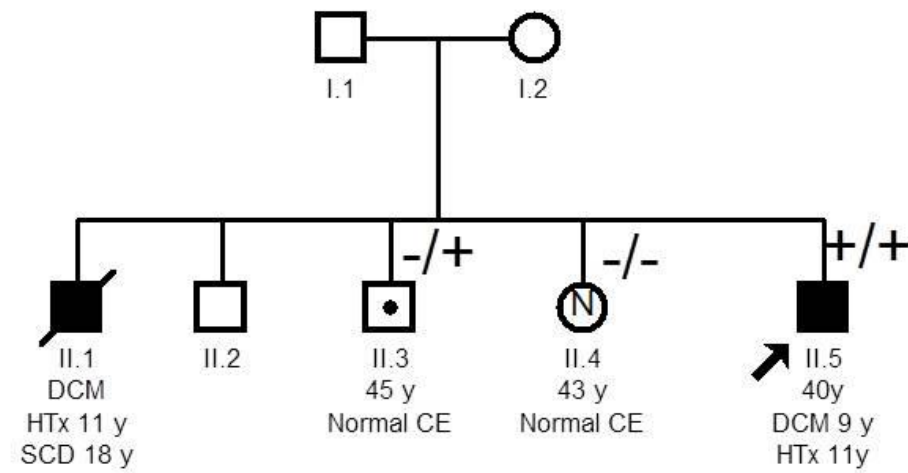




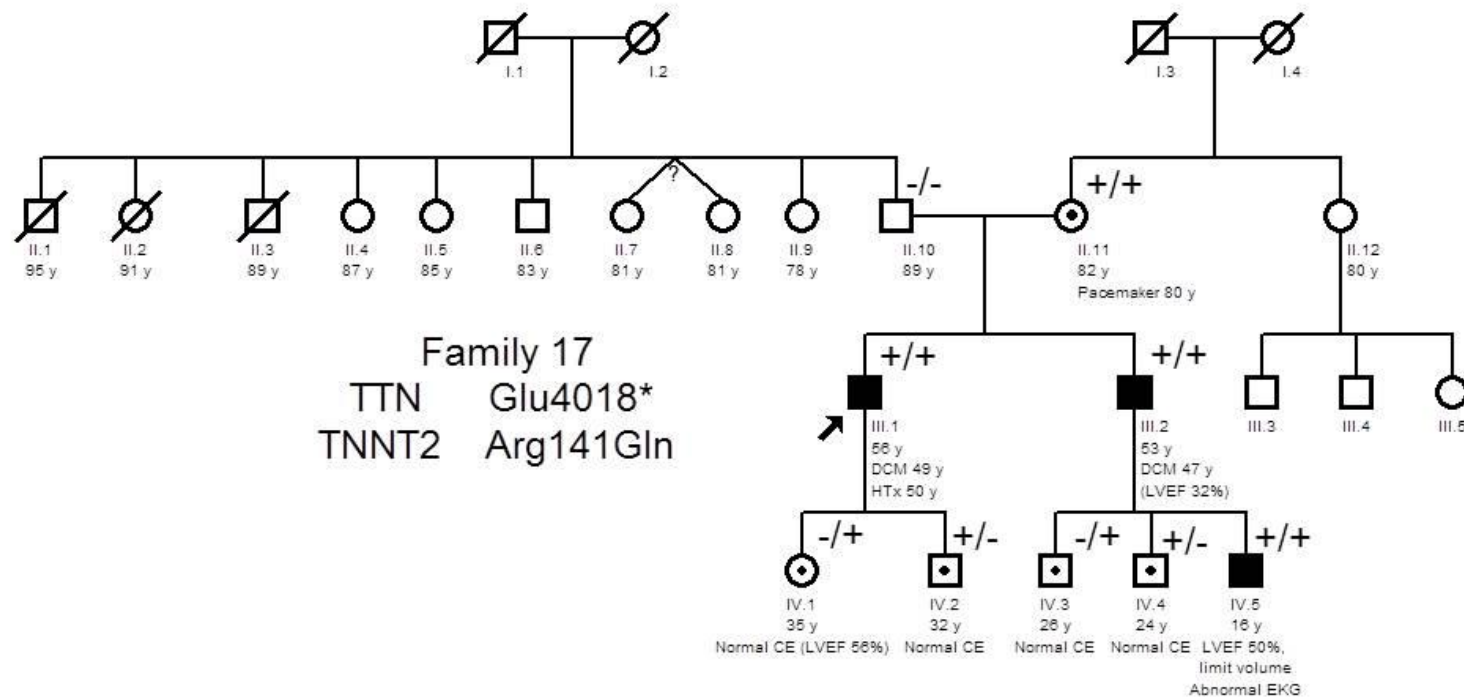


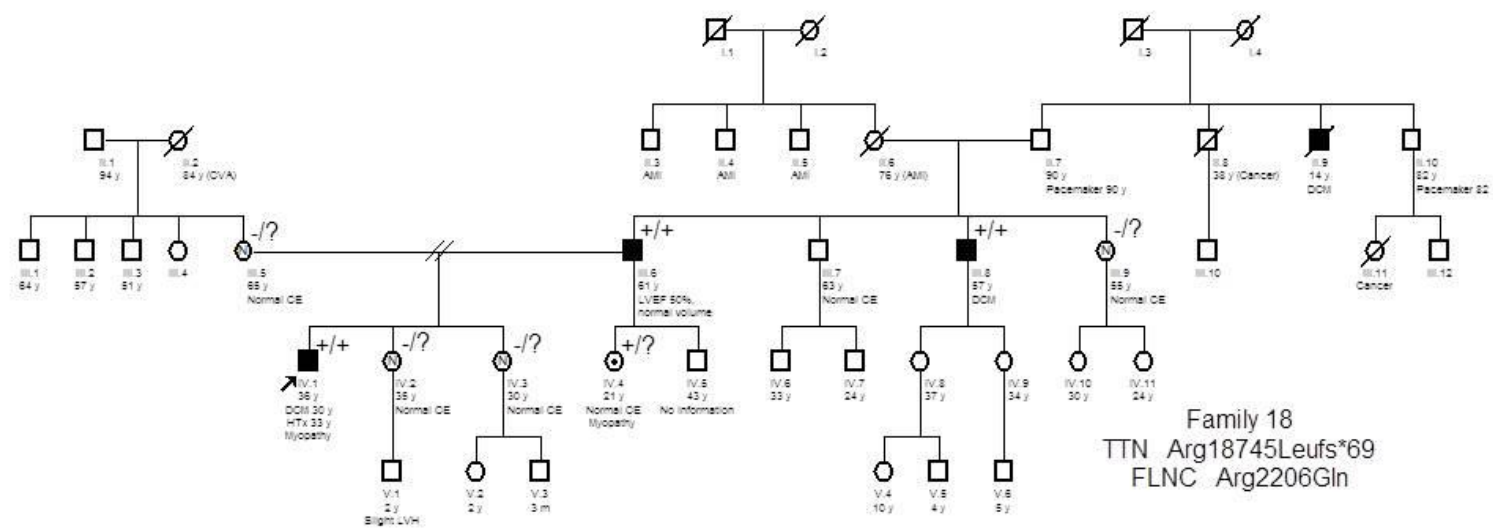


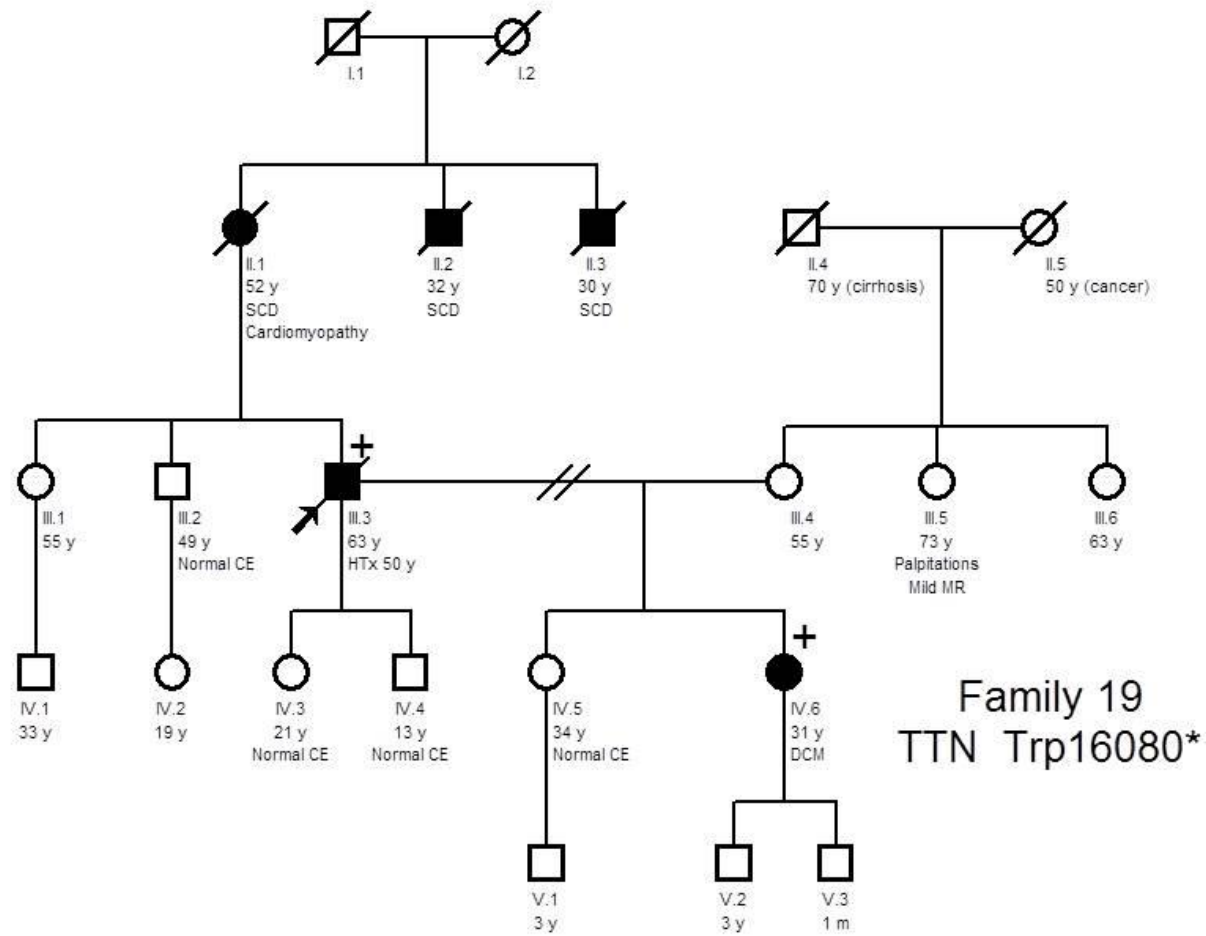


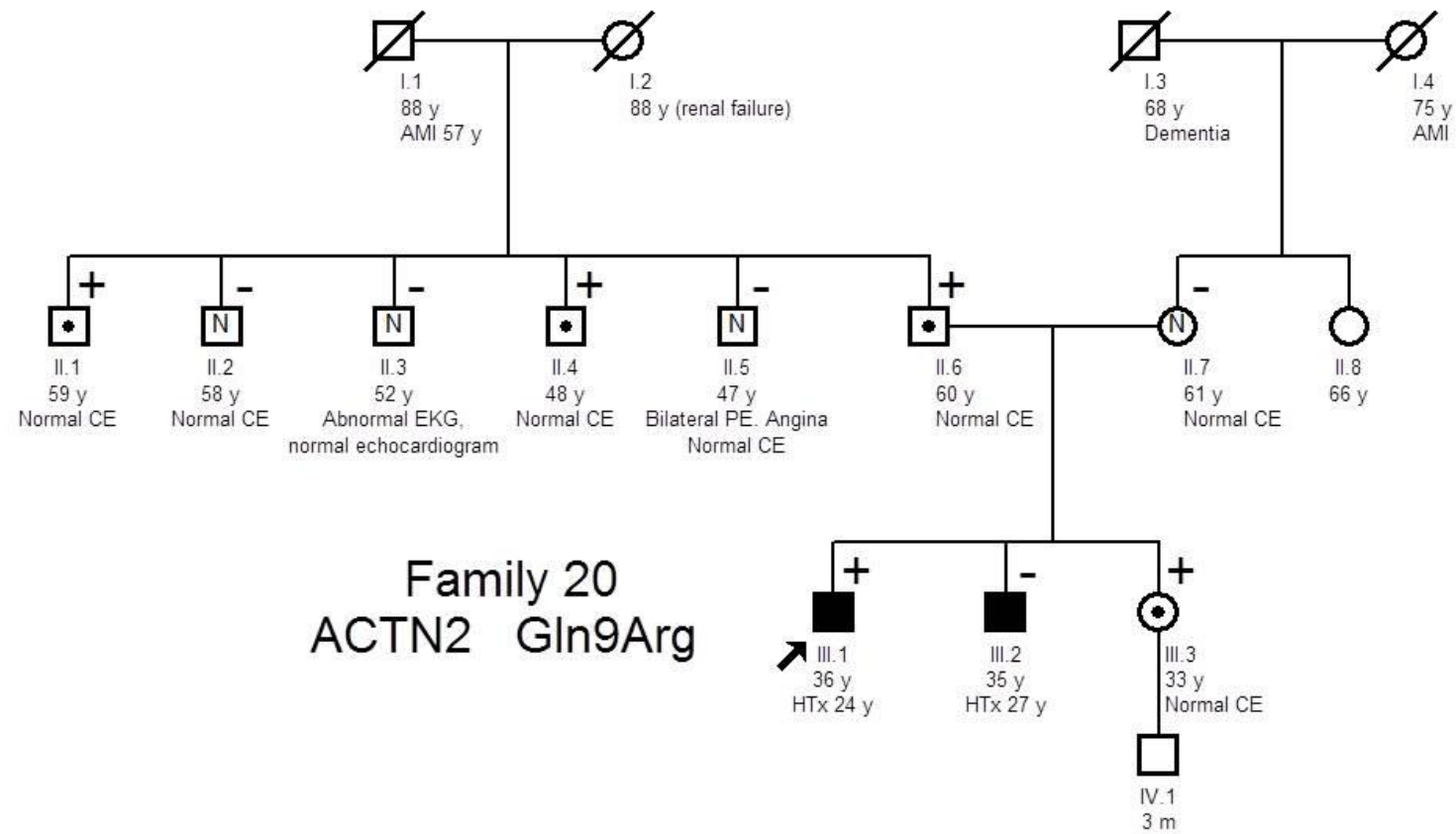


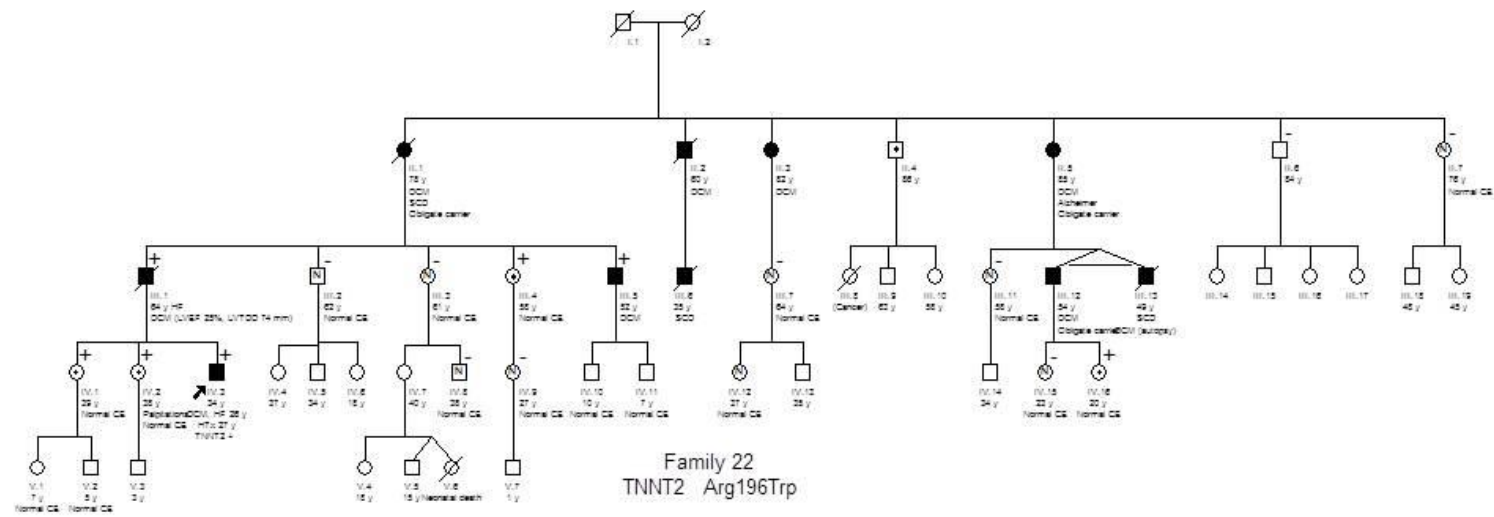
Family 16
PKP2 c.223+1G>A
PKP2 c.156G>C Lys52Asn

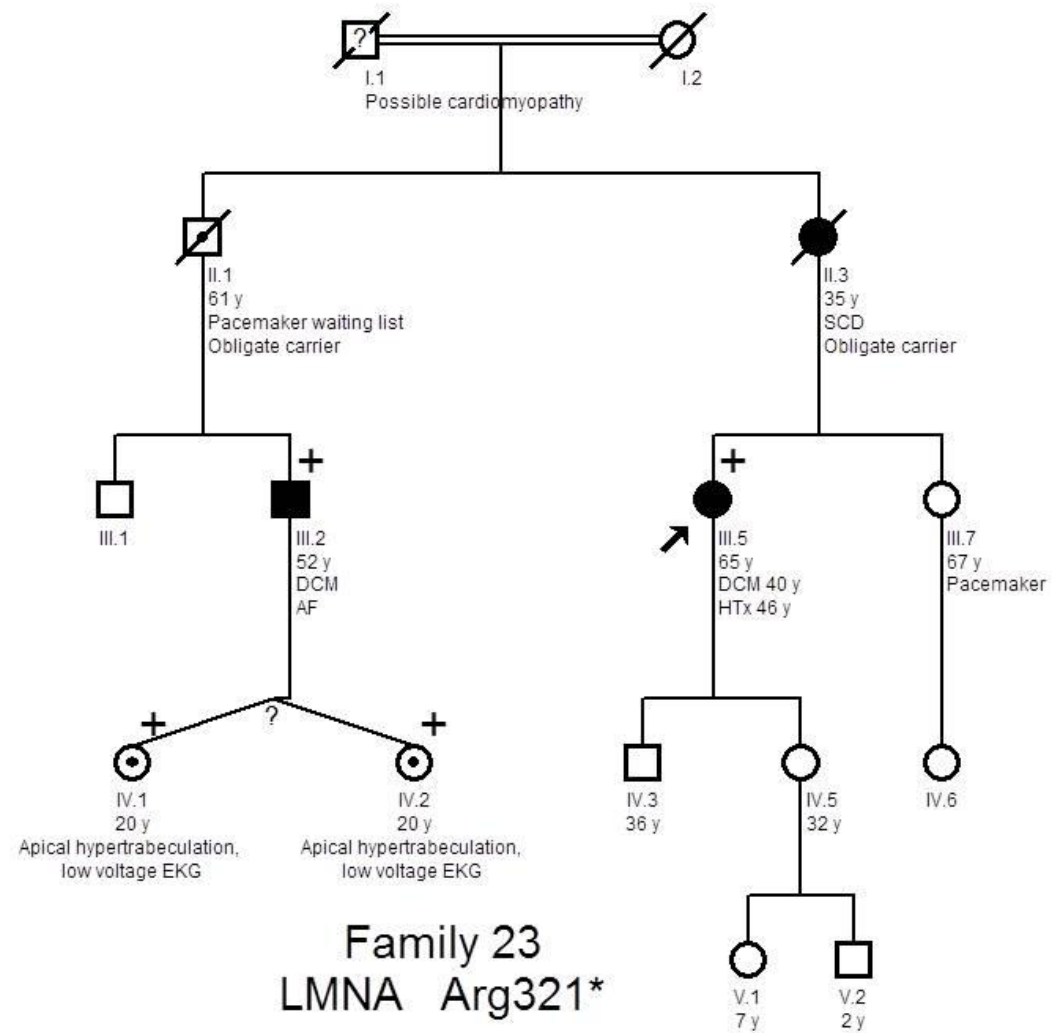


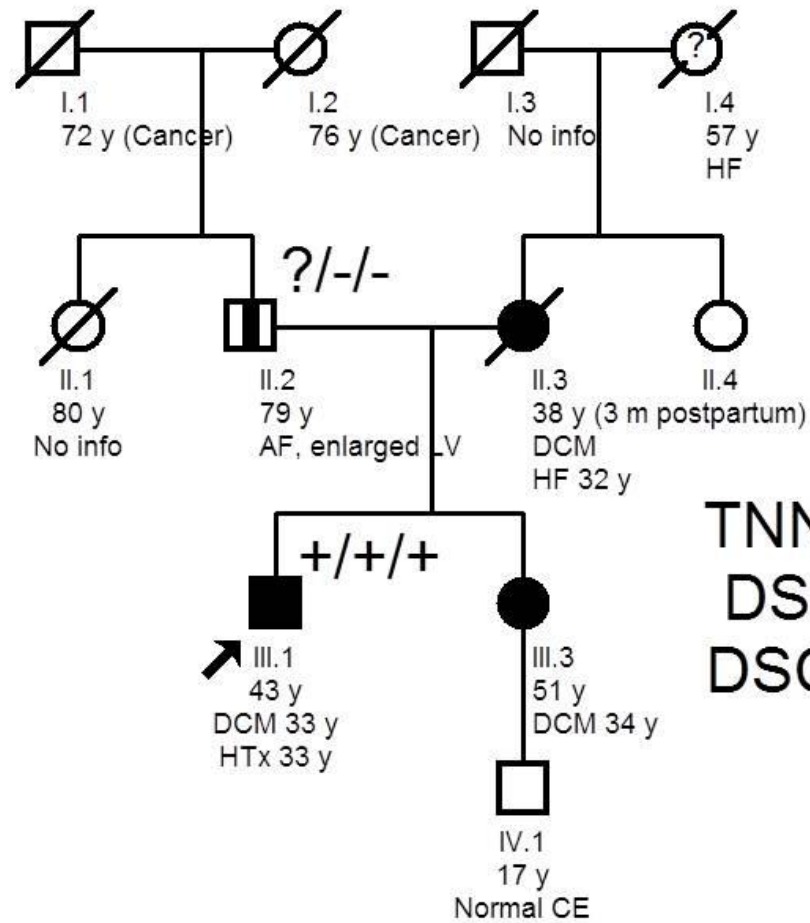






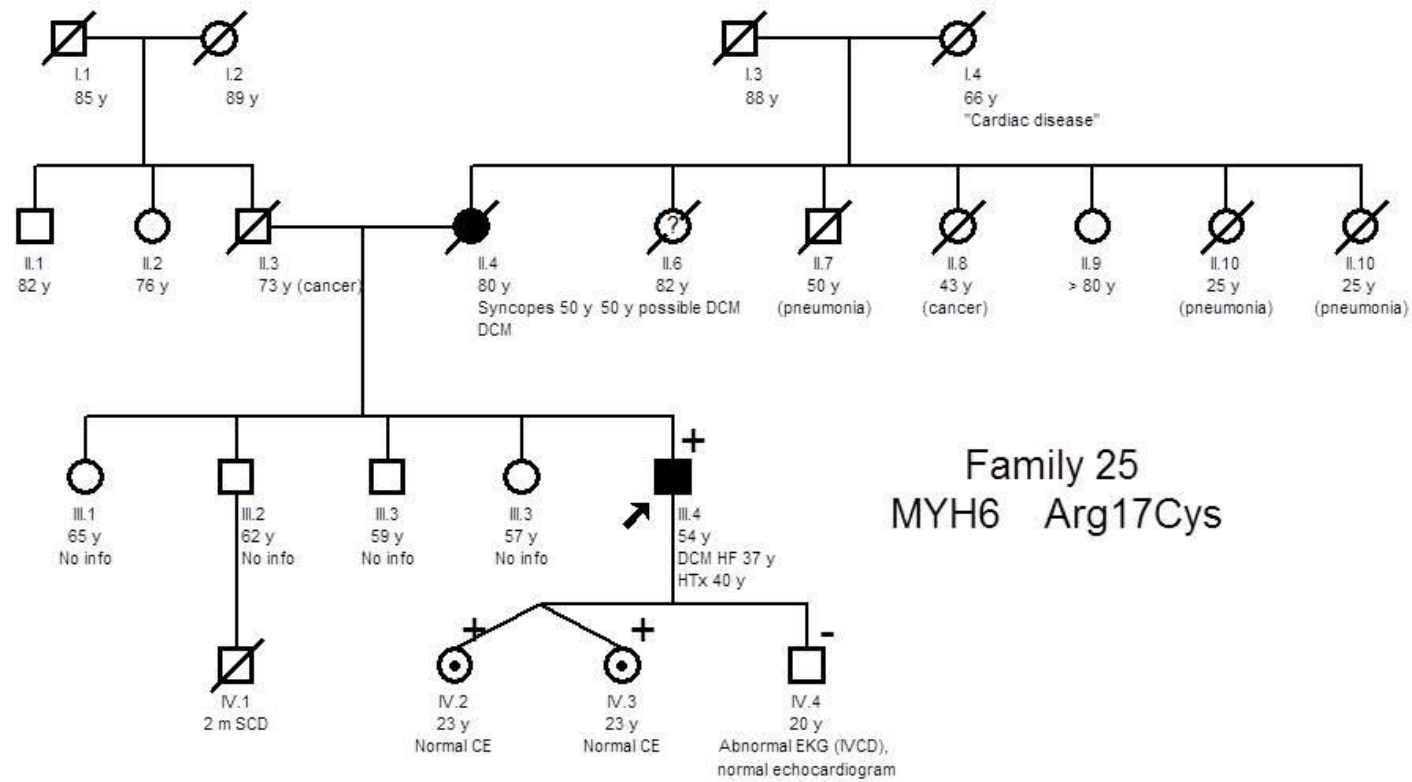


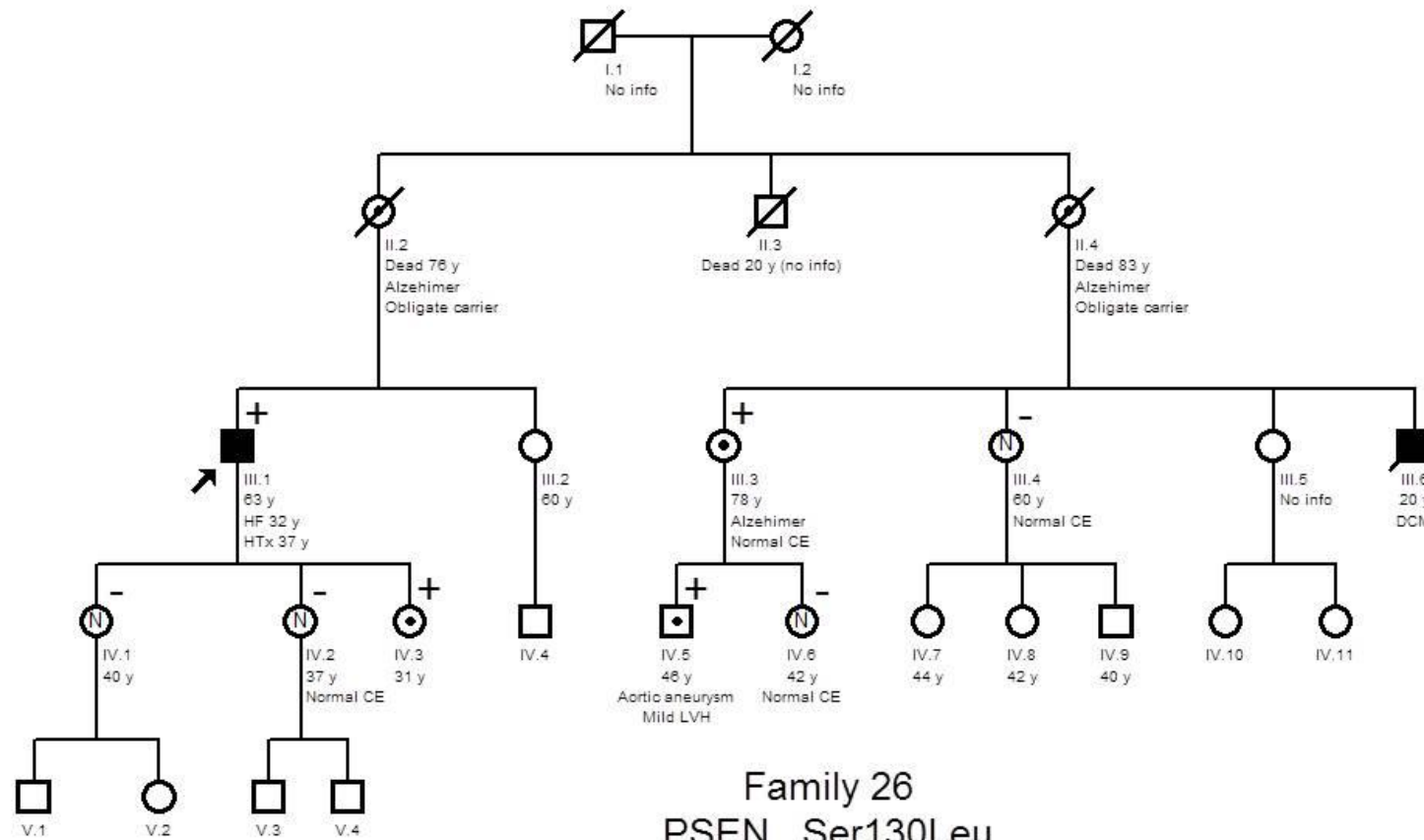


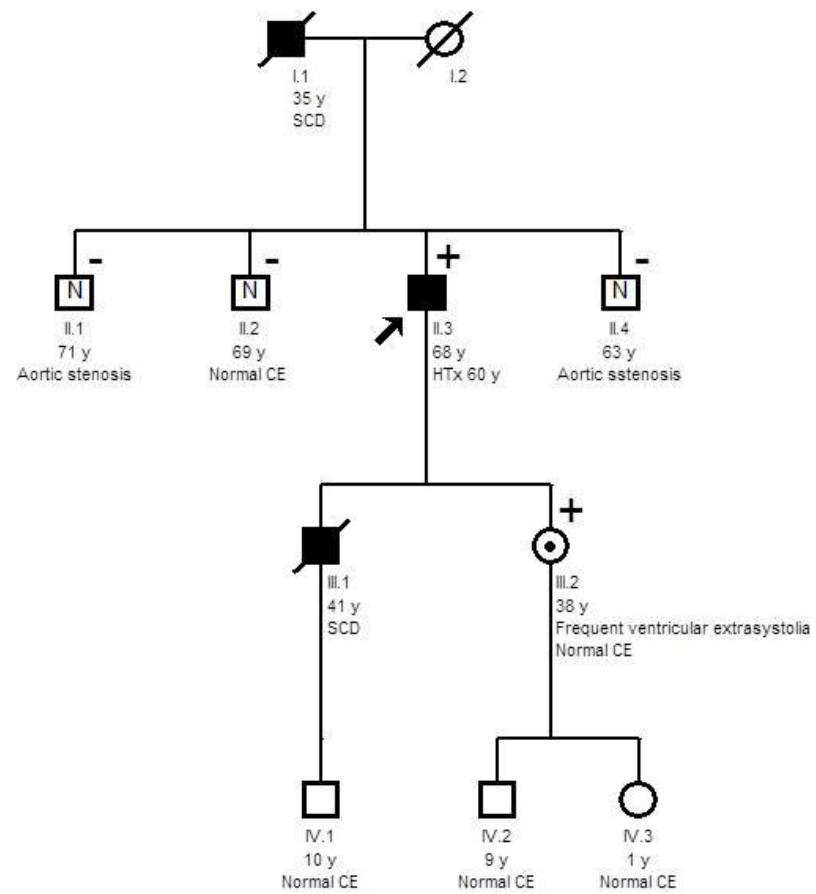


Family 24

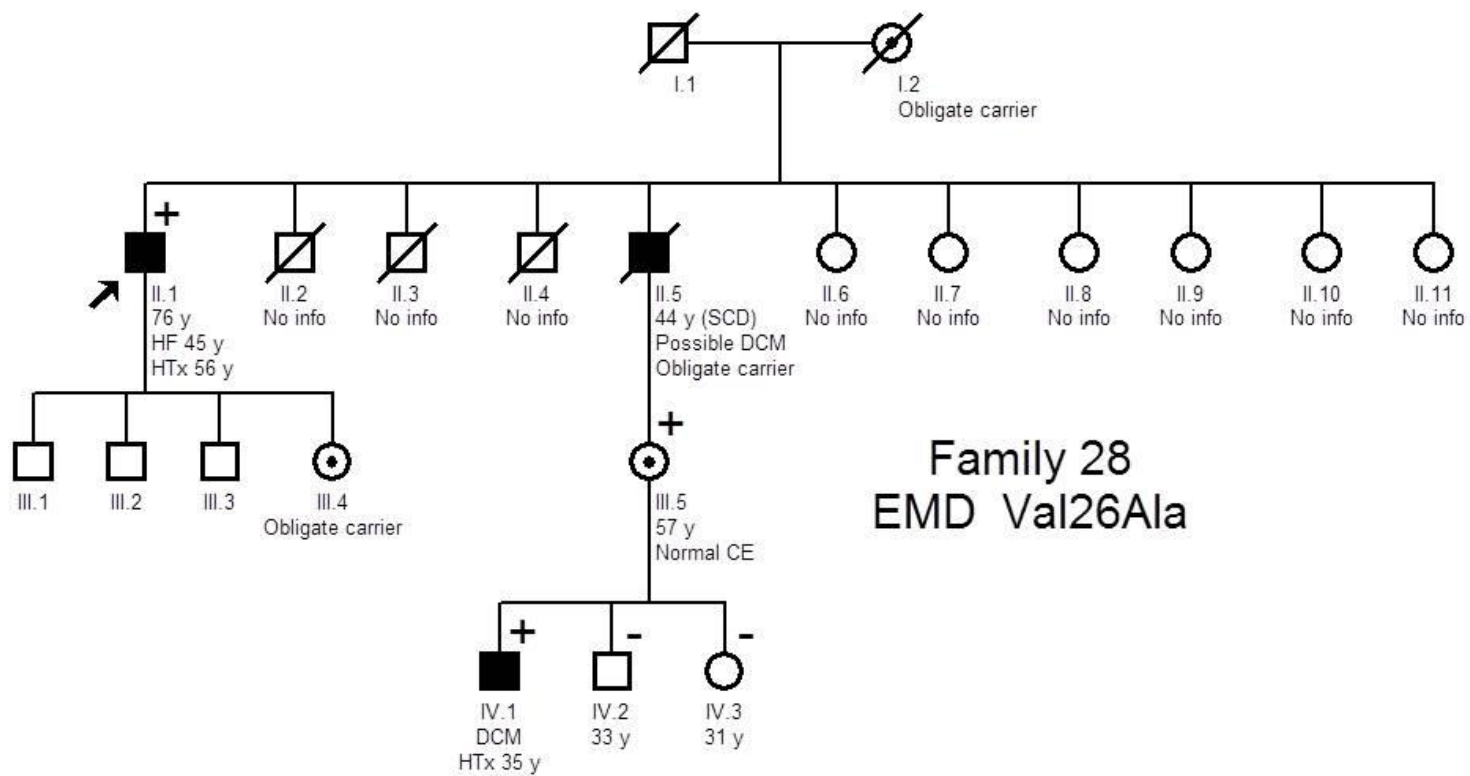
TNNC1	Glu134Lys
DSG2	Val392Ile
DSC2	Leu732Val

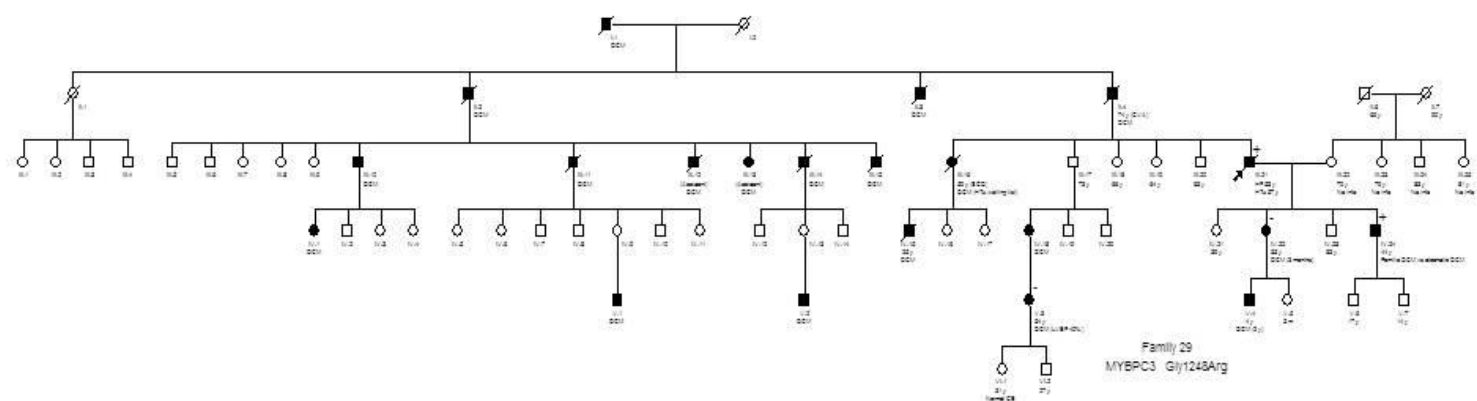


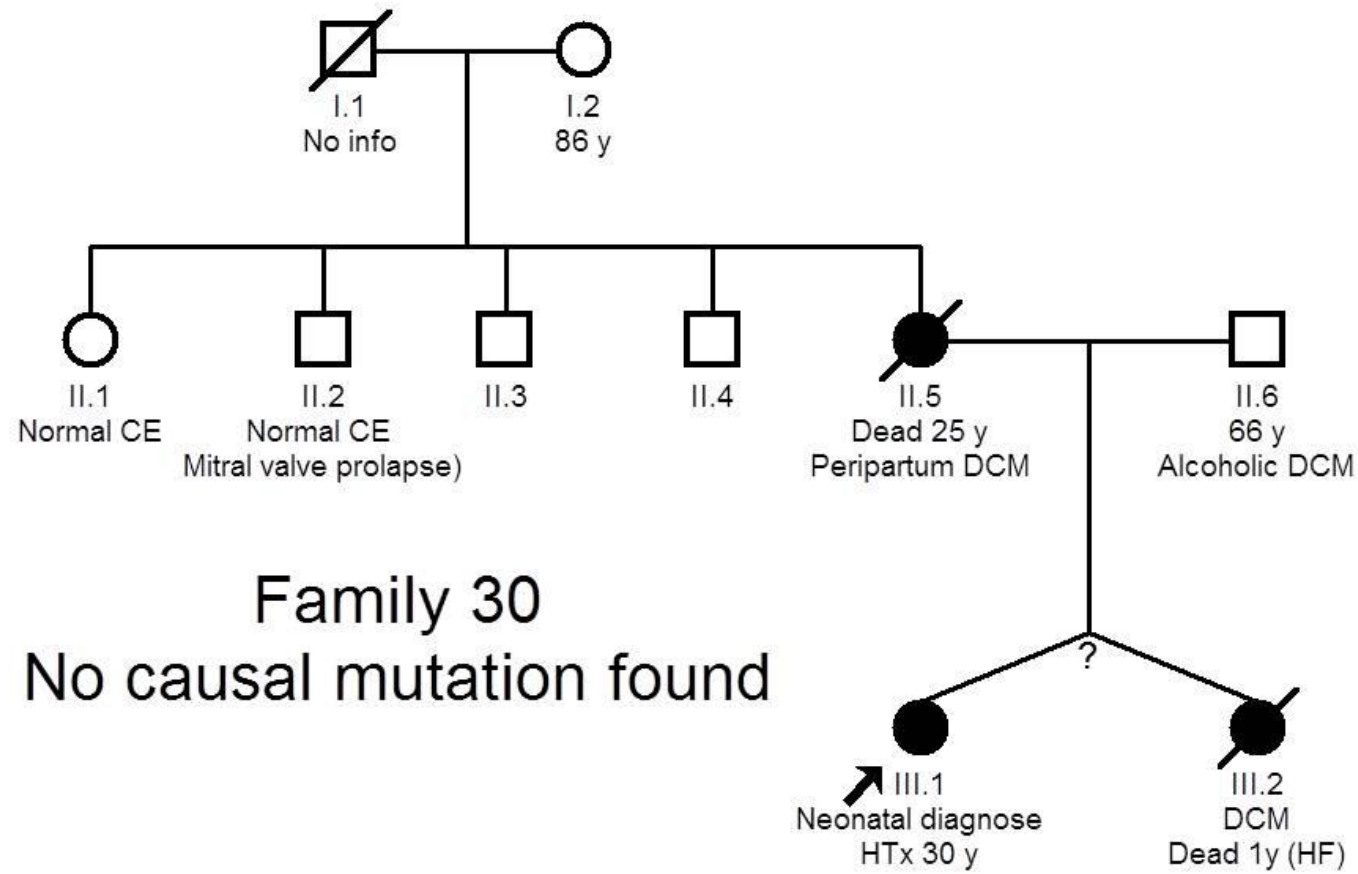


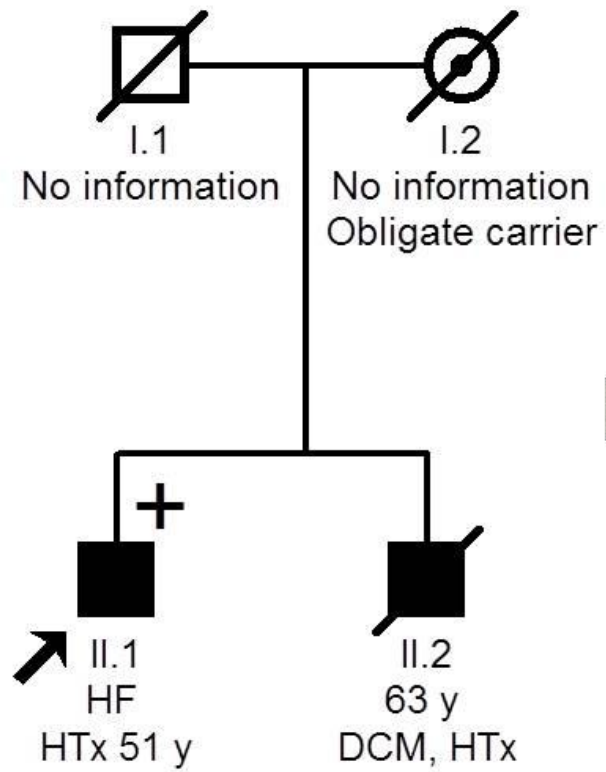


Family 27
 FLNC Asn1369Lysfs*36

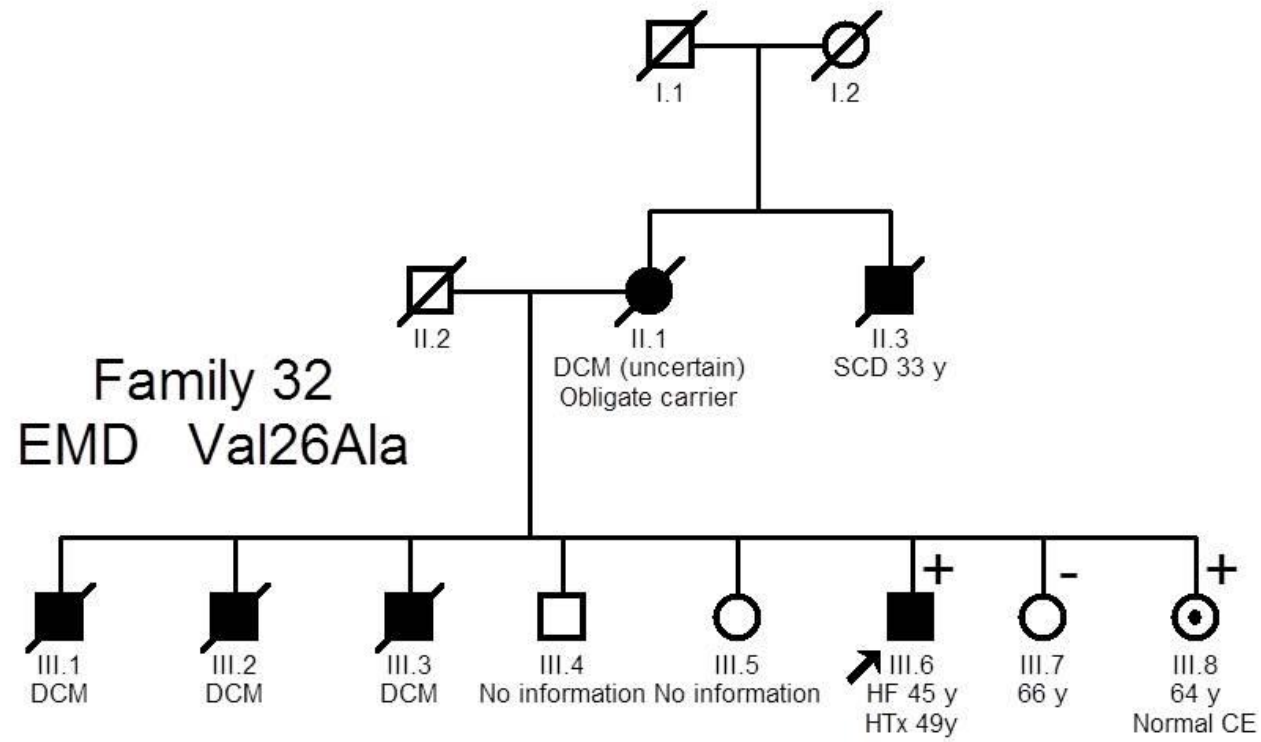


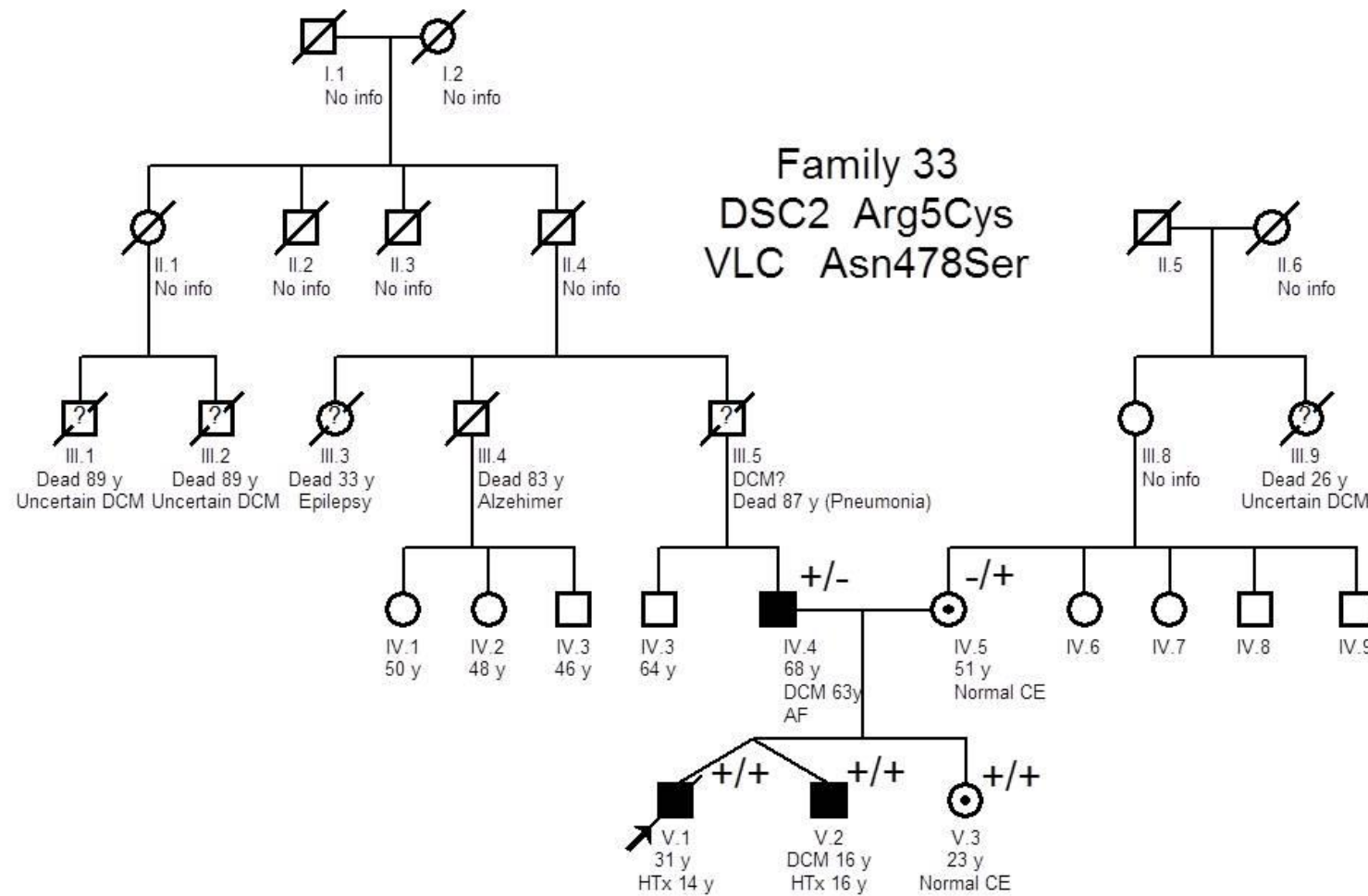


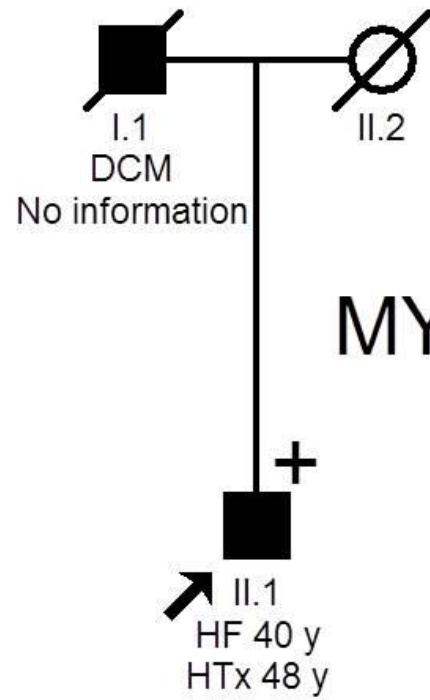




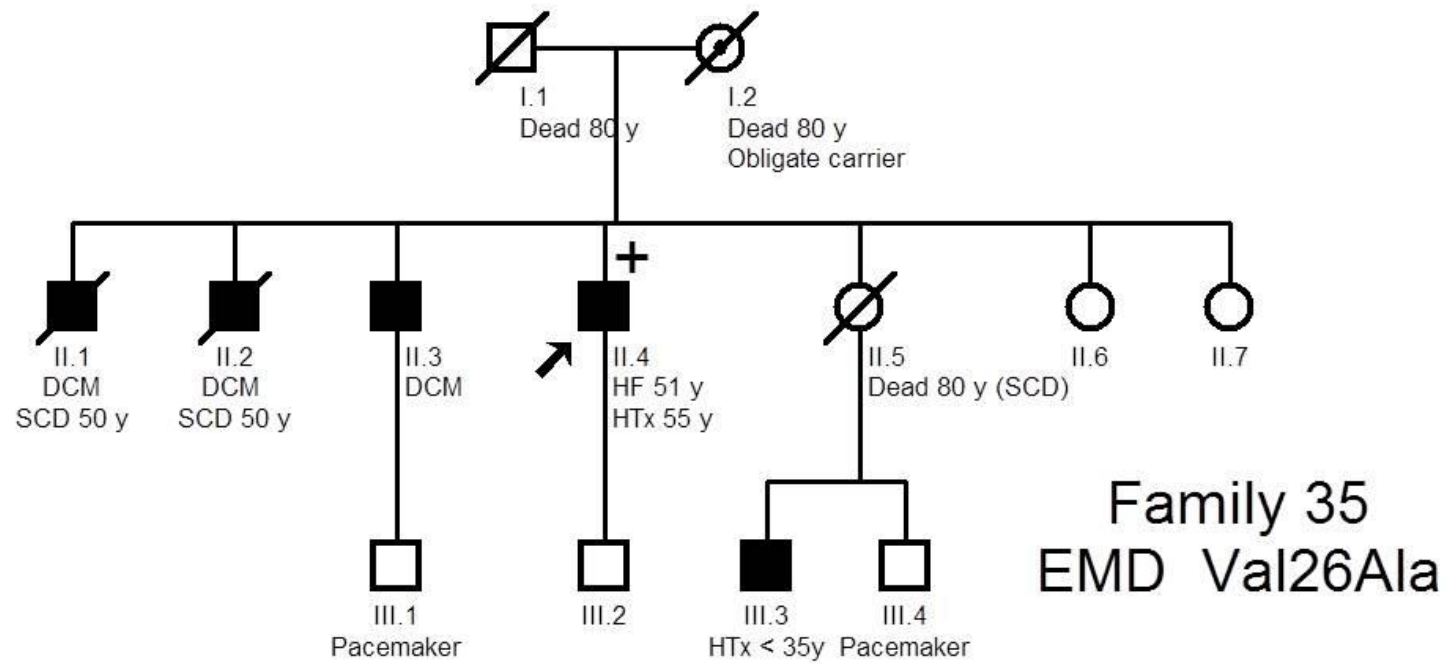
Family 31
EMD Val26Ala

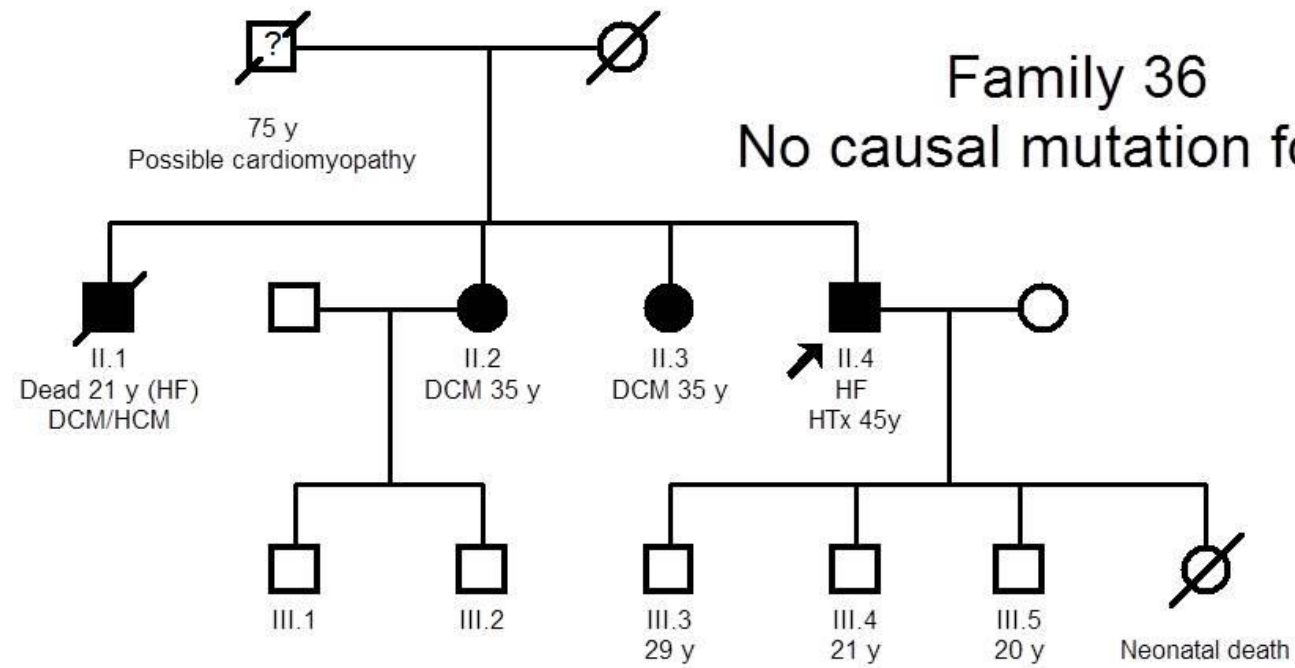


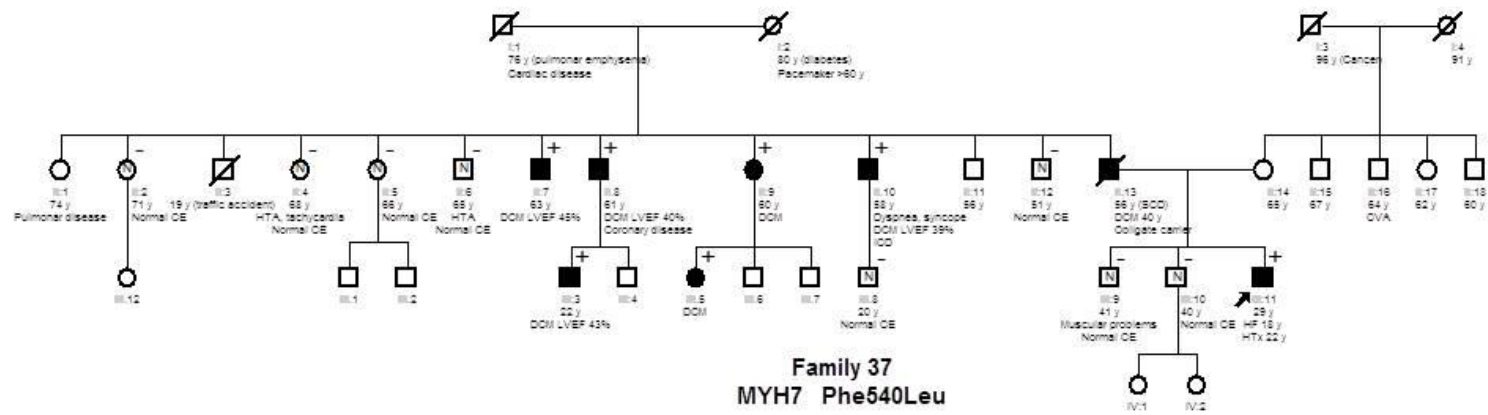


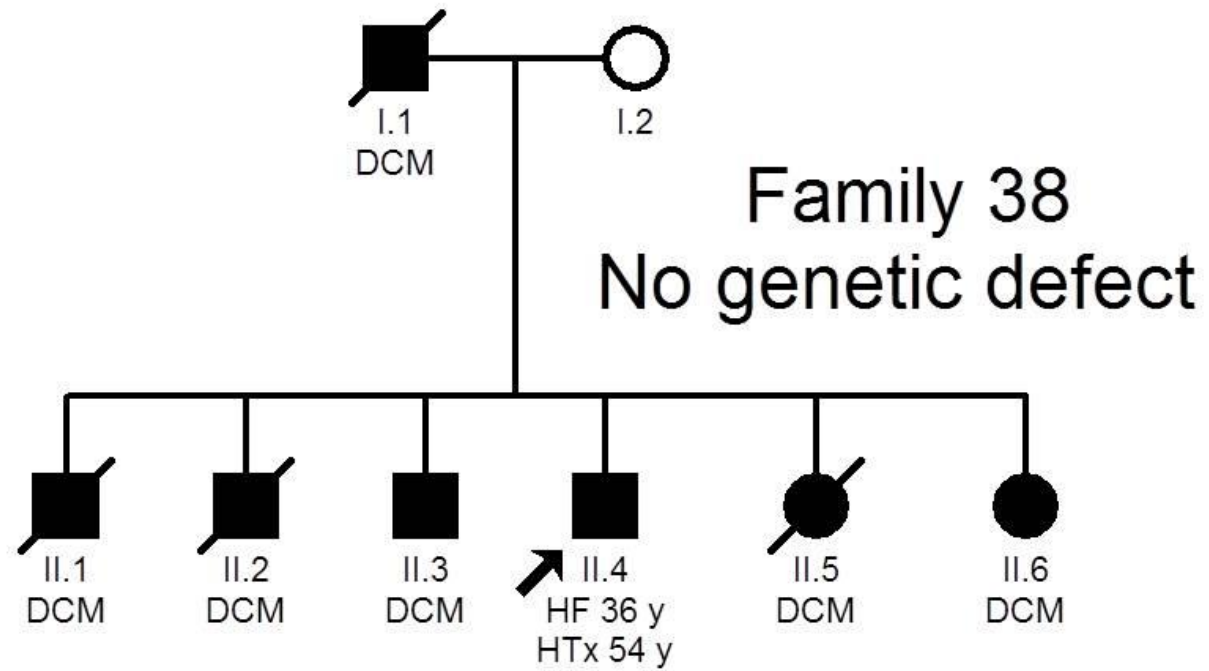


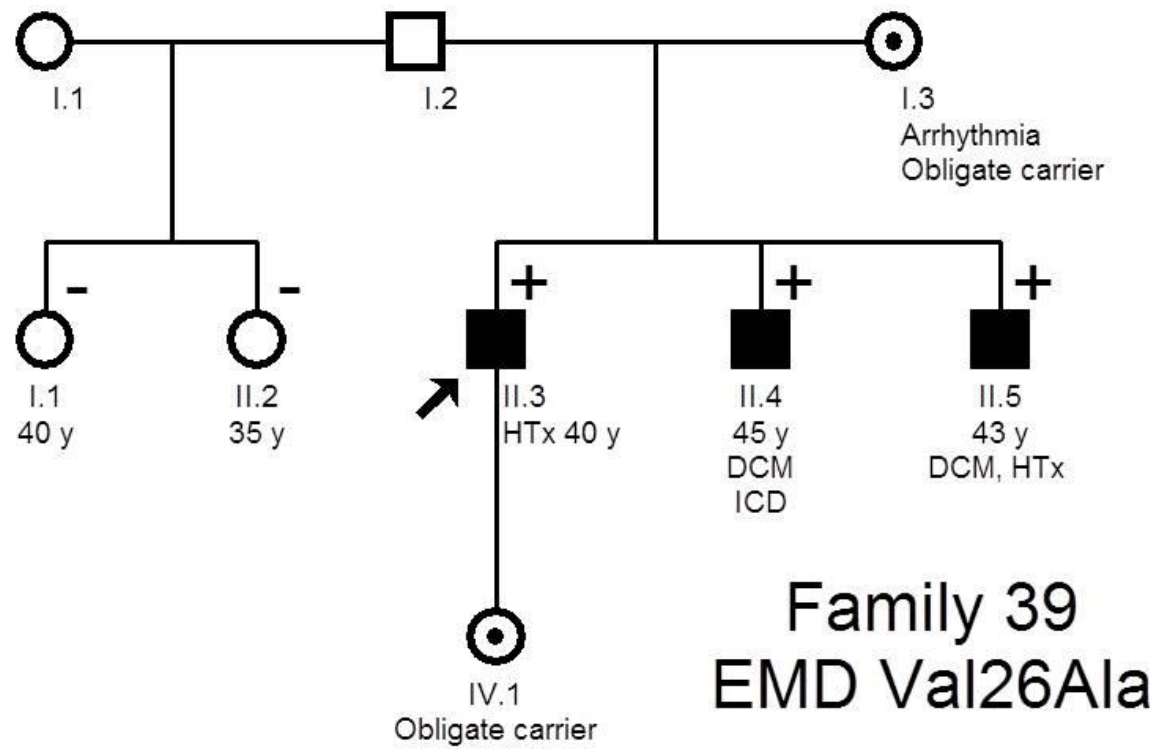
Family 34
MYBPC3 Asp198Glu

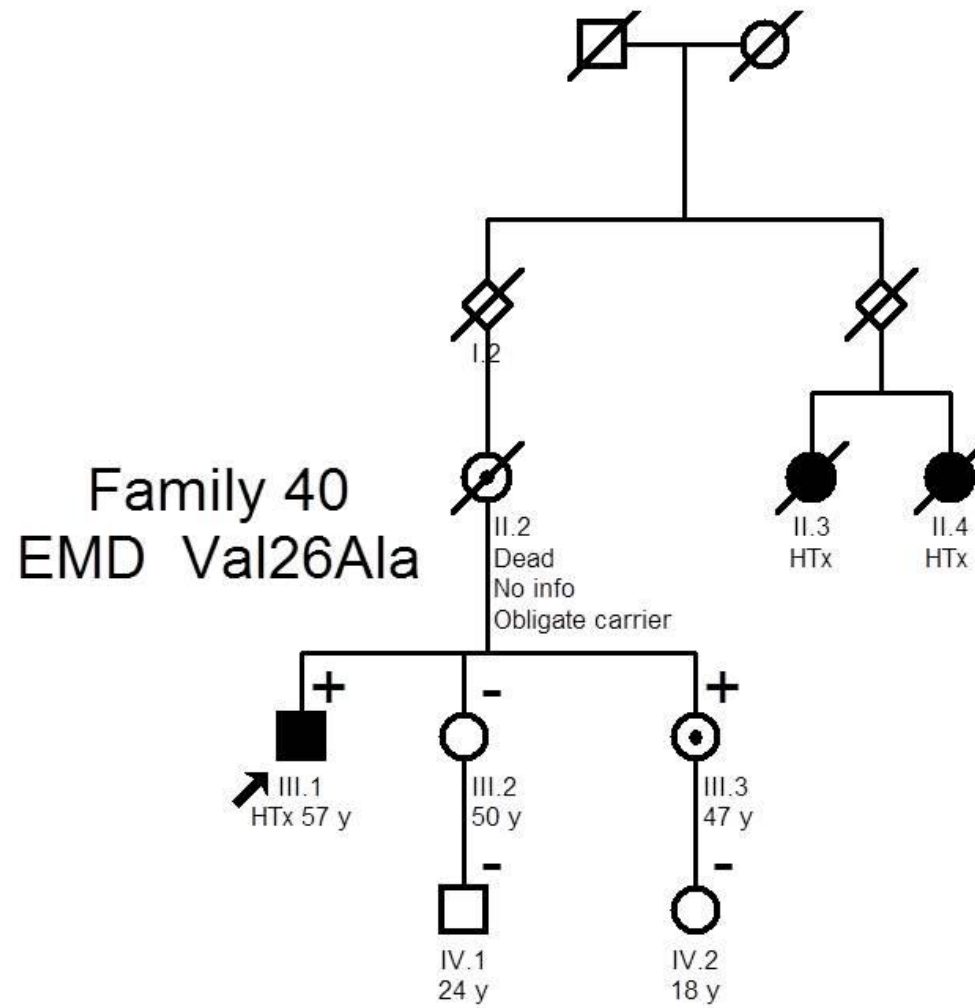


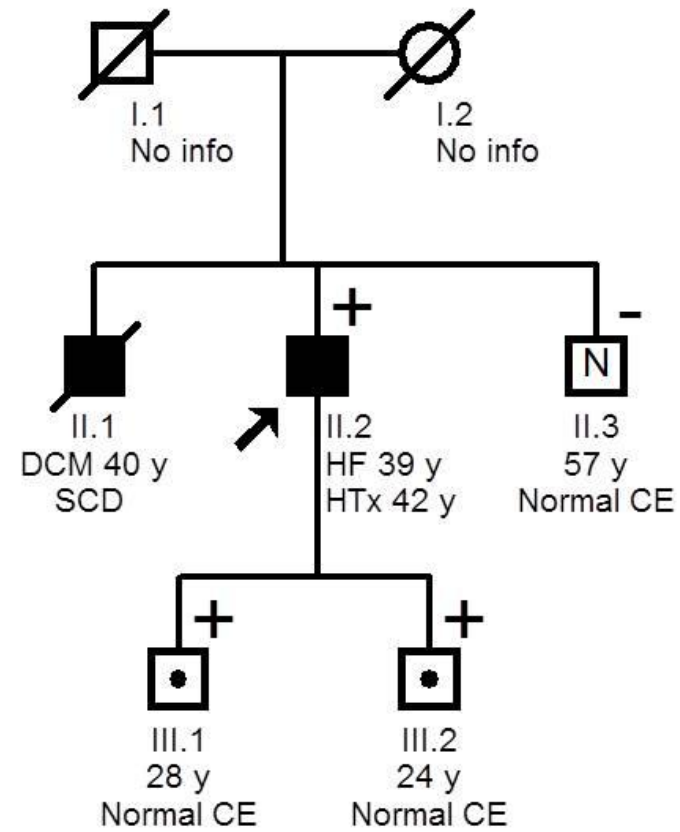




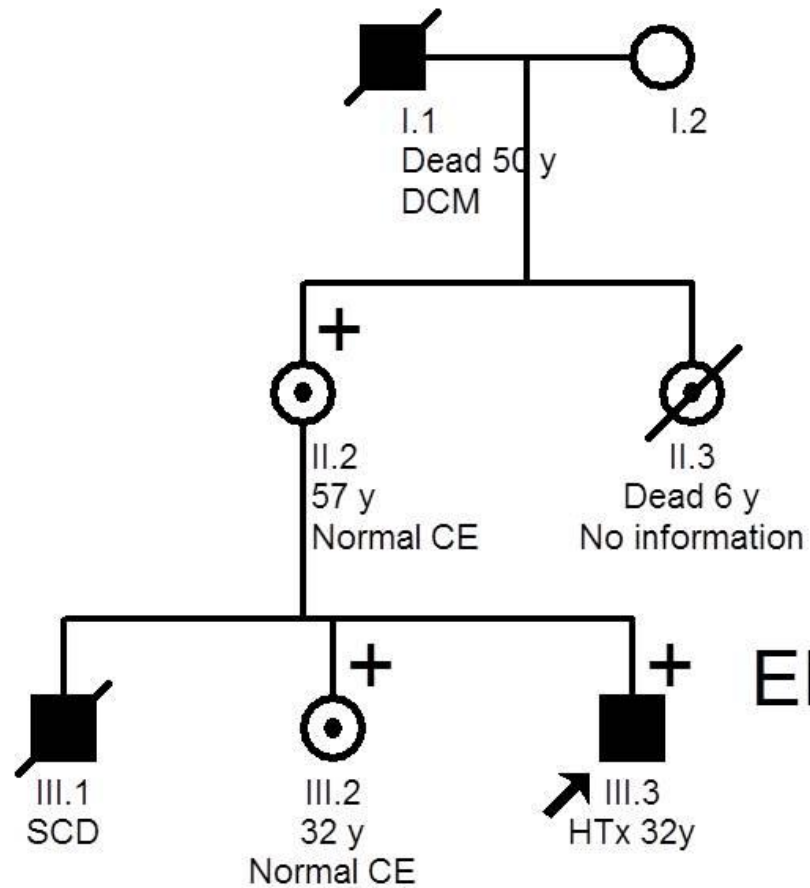




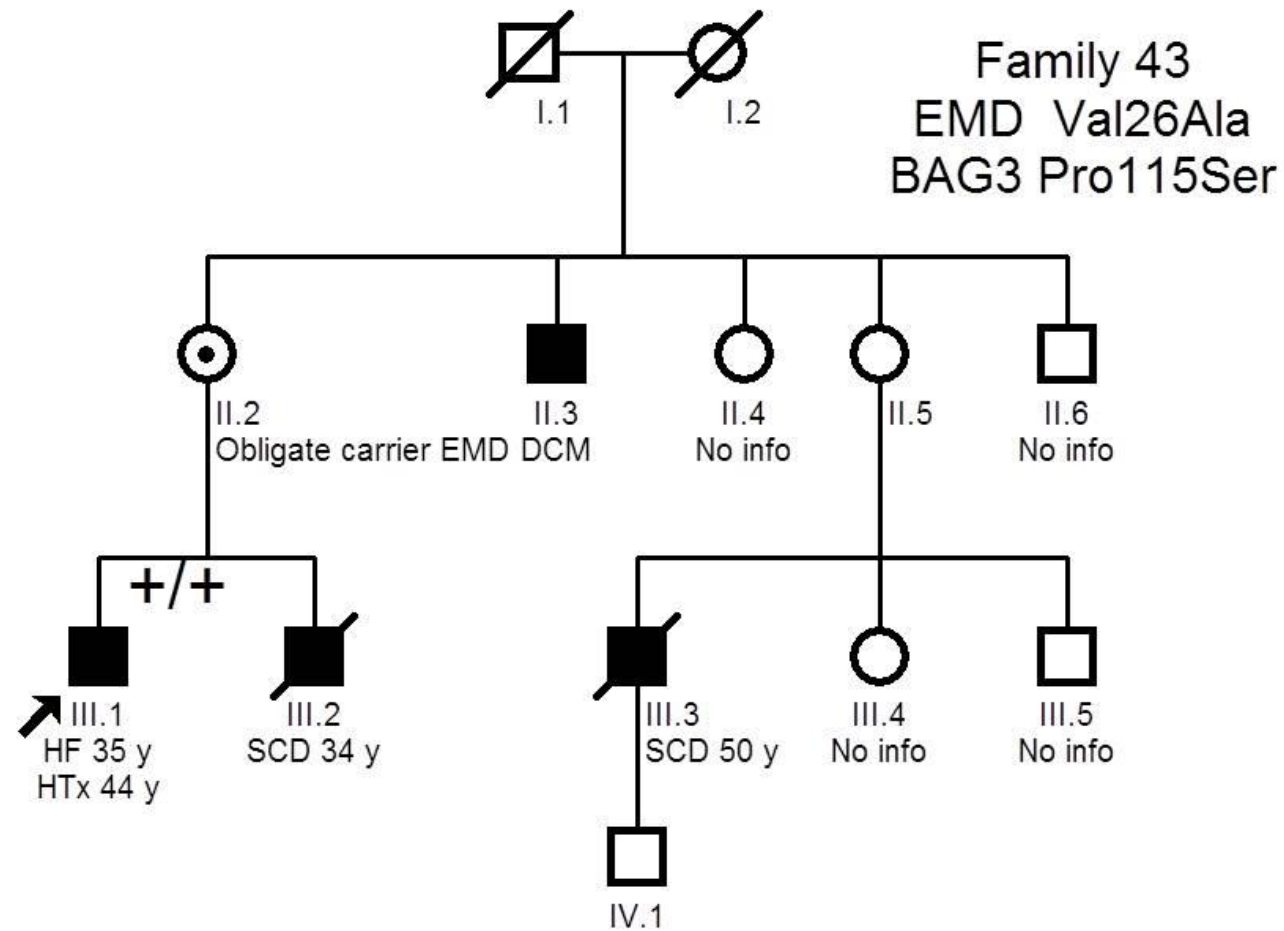


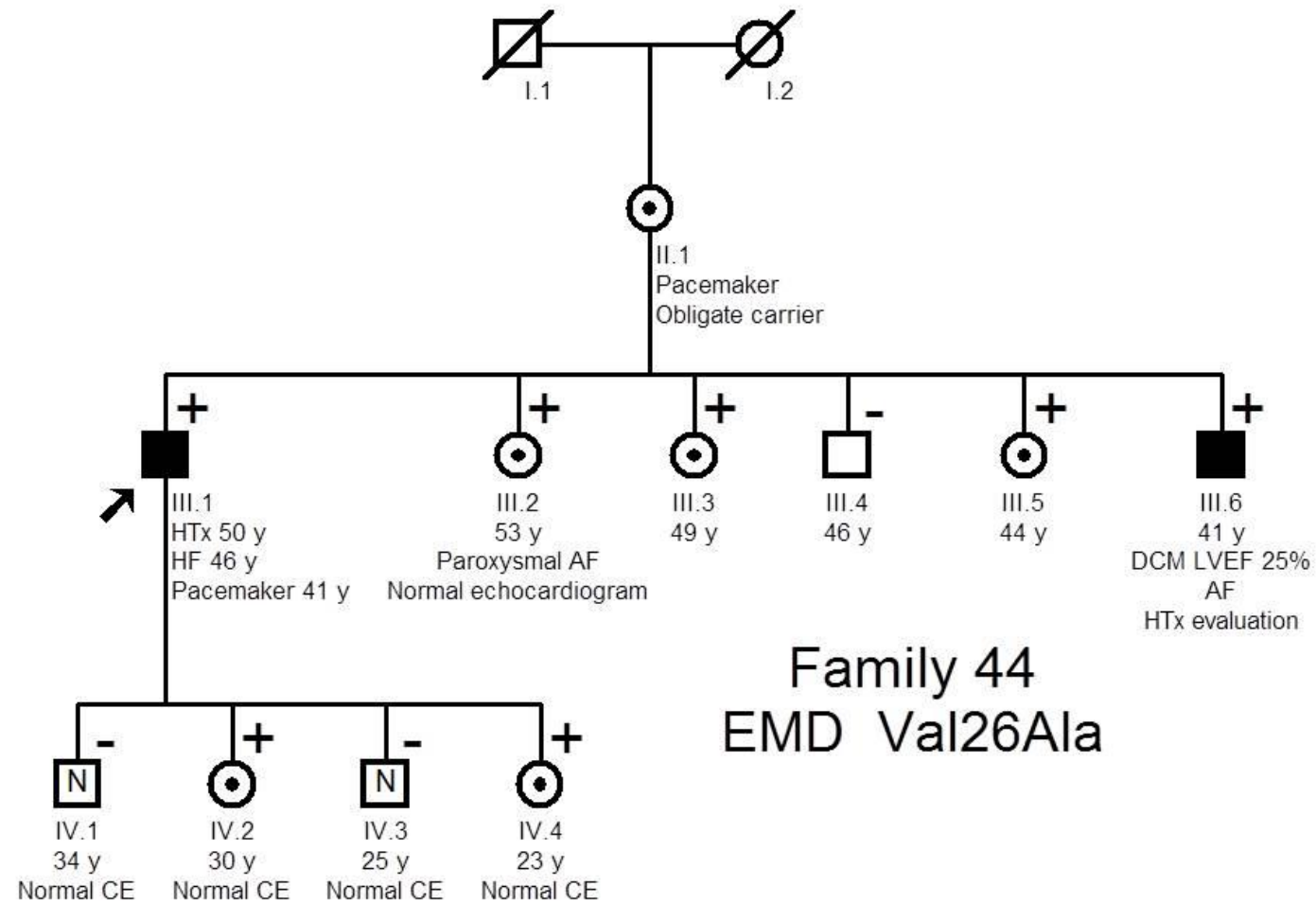


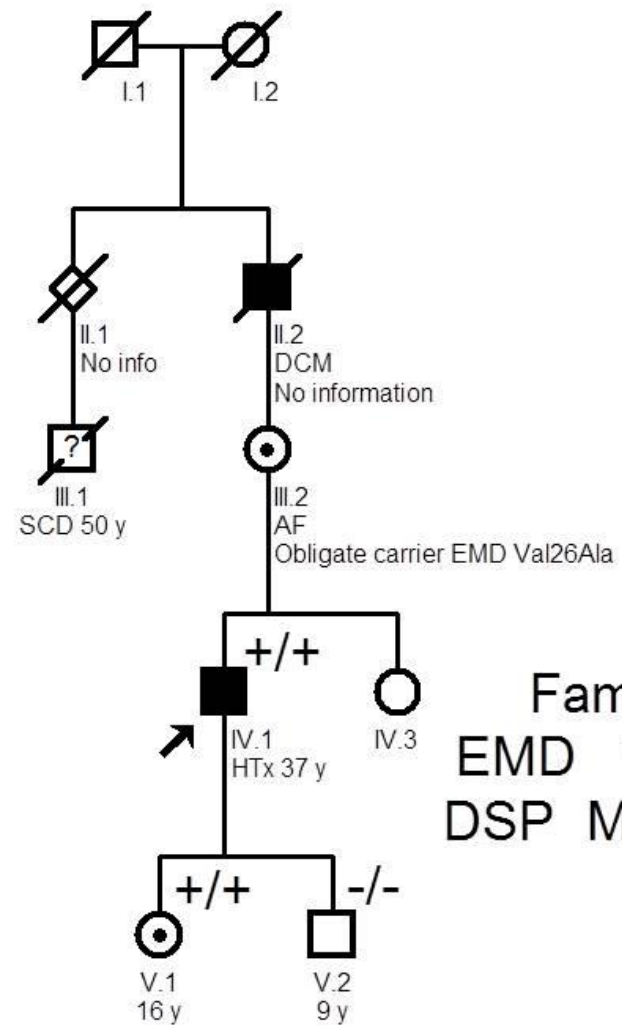
Family 41
DSP Arg1951*



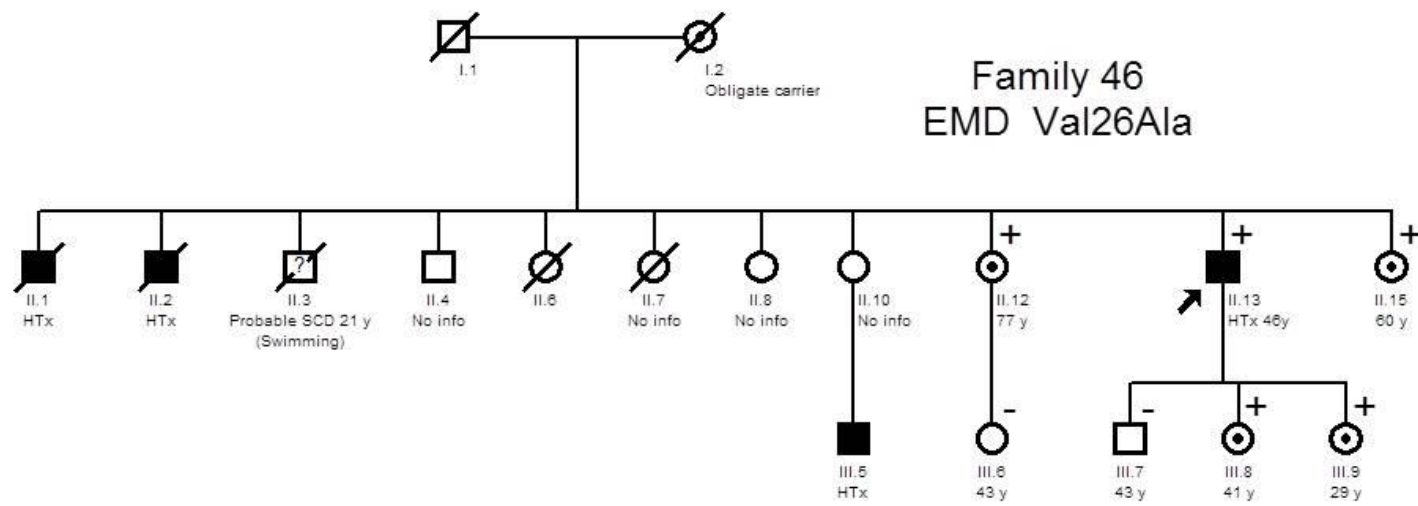
Family 42
EMD Val26Ala

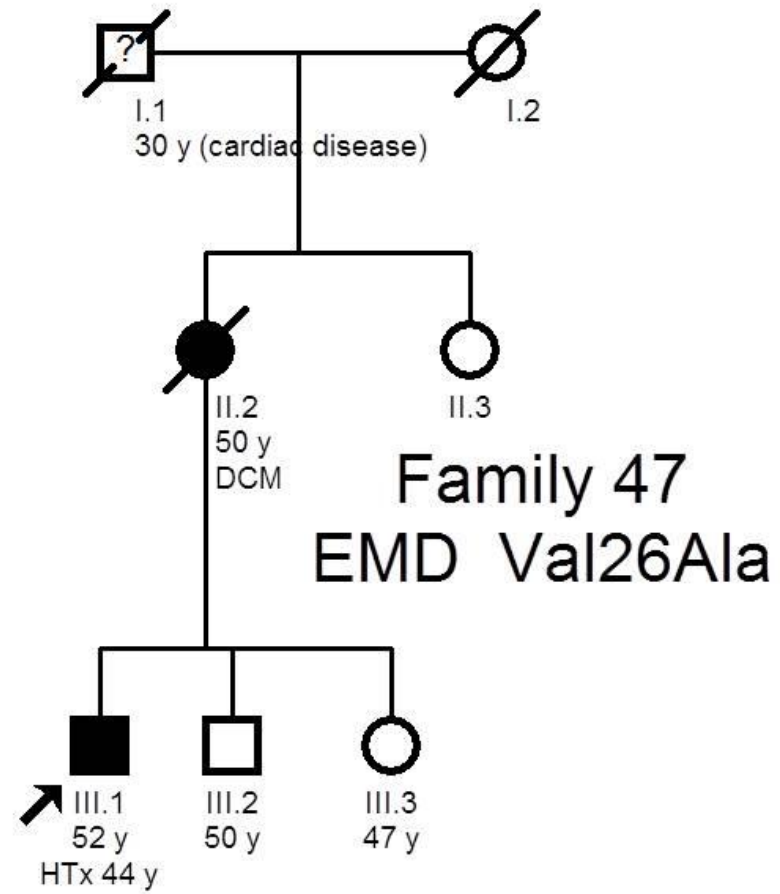


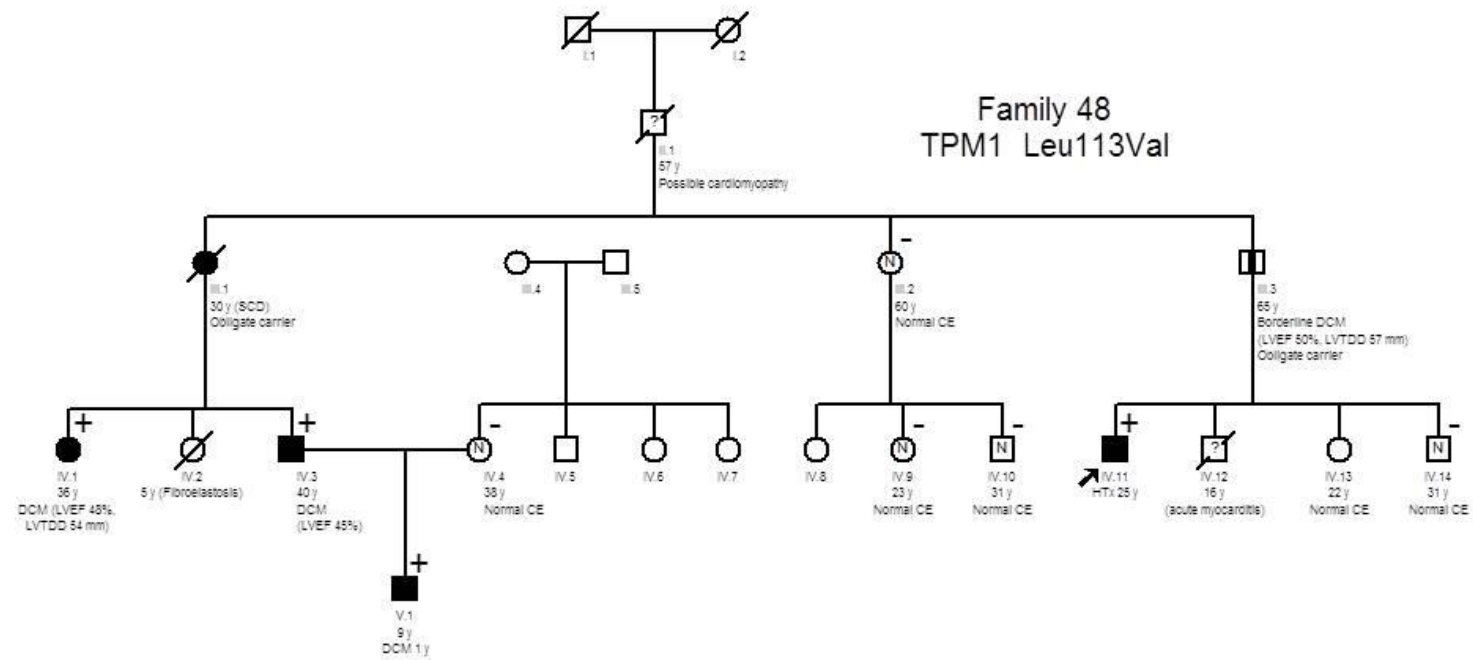


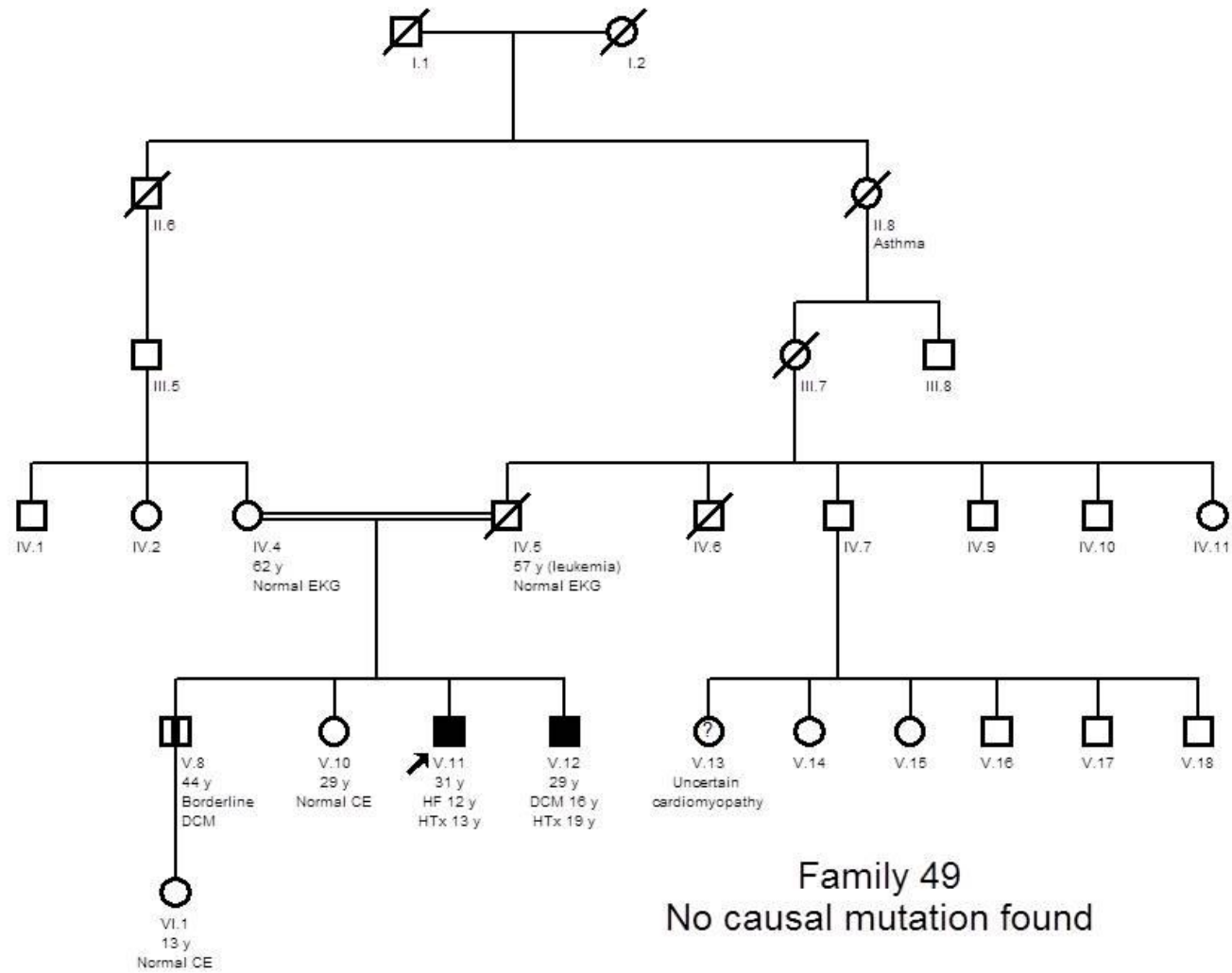


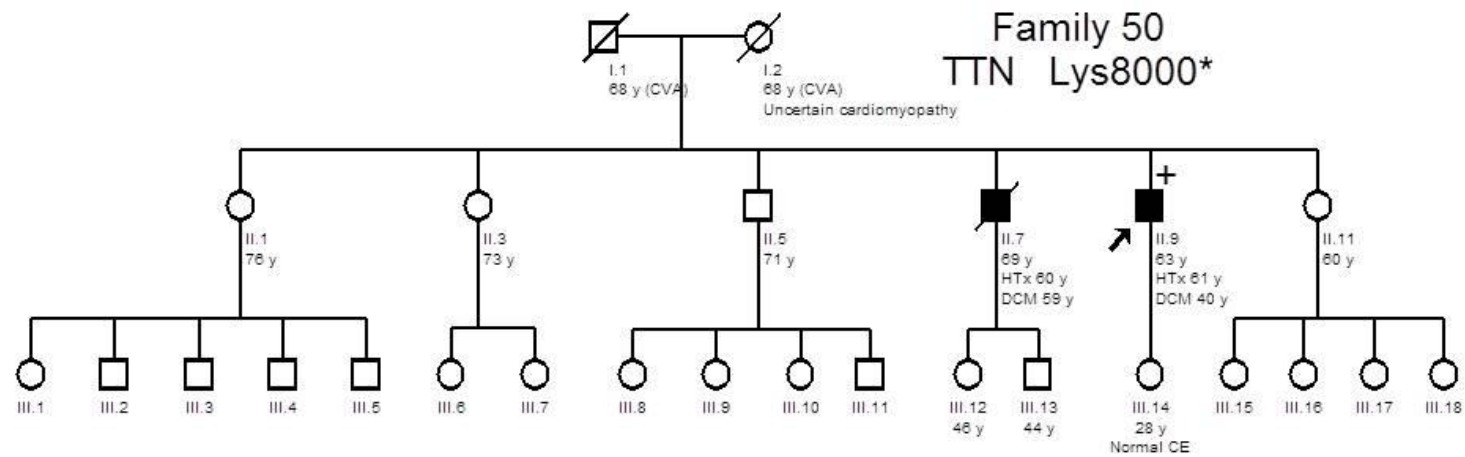
Family 45
EMD Val26Ala
DSP Met729Thr

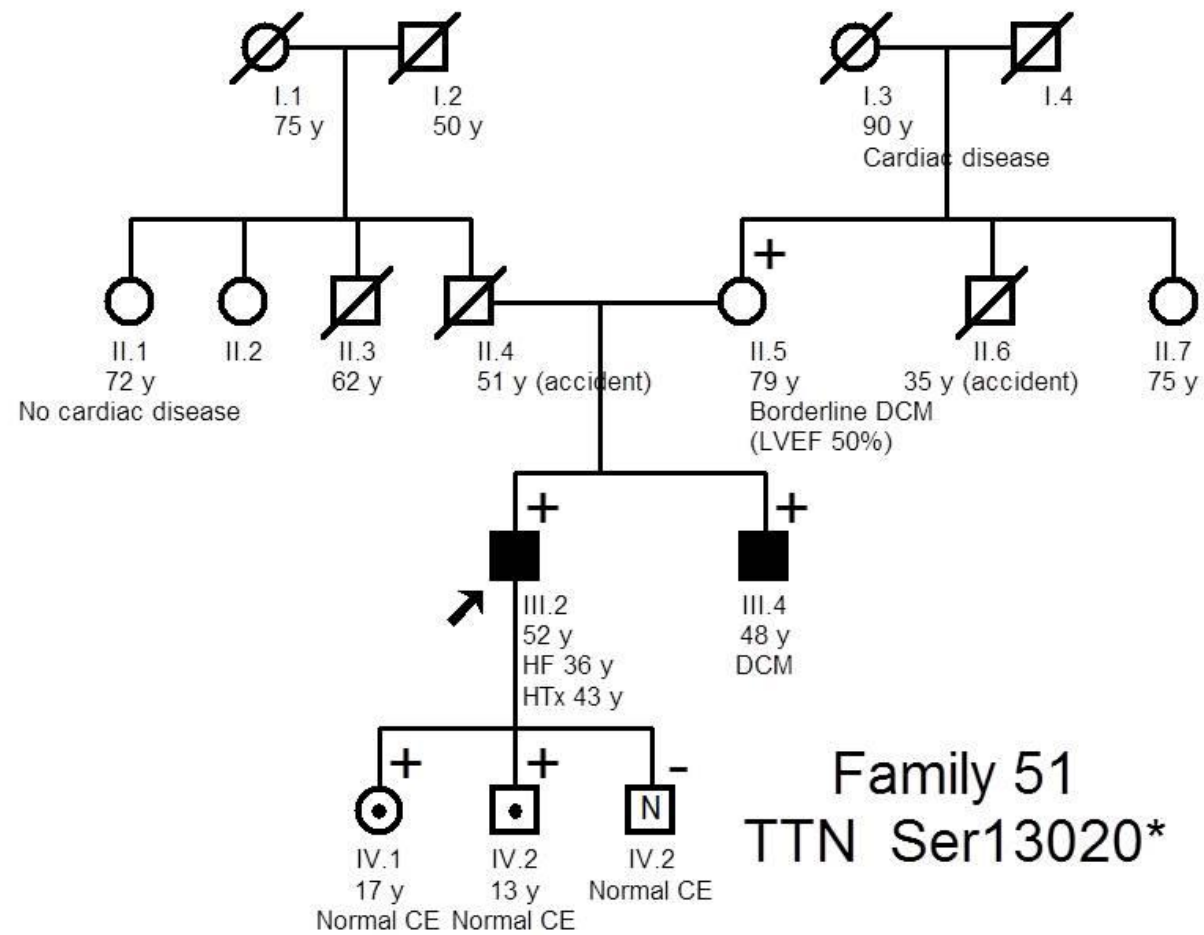


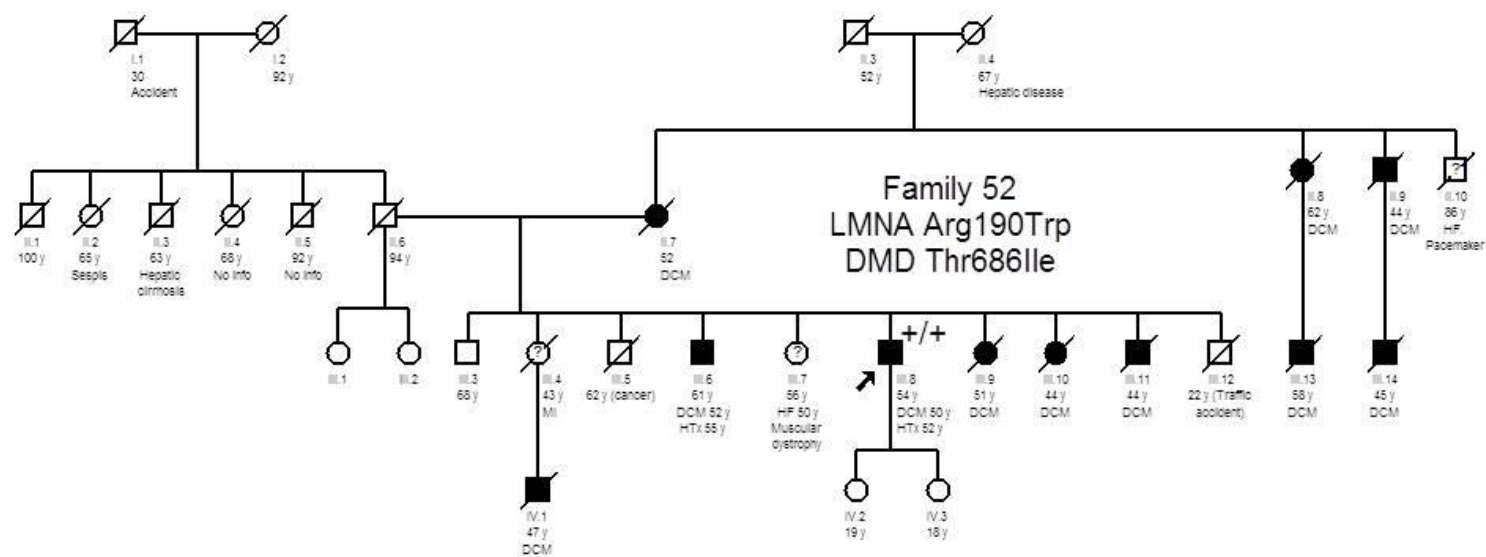












BIBLIOGRAFÍA

1. Elliott, P., et al., Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J*, 2008. 29(2): p. 270-6.
2. Report of the WHO/ISFC task force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Br Heart J*, 1980. 44(6): p. 672-3.
3. Richardson, P., et al., Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation*, 1996. 93(5): p. 841-2.
4. Dec, G.W. and V. Fuster, Idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med*, 1994. 331(23): p. 1564-75.
5. Luk, A., et al., Dilated cardiomyopathy: a review. *J Clin Pathol*, 2009. 62(3): p. 219-25.
6. Elliott, P., Cardiomyopathy. Diagnosis and management of dilated cardiomyopathy. *Heart*, 2000. 84(1): p. 106-12.
7. Sugrue, D.D., et al., The clinical course of idiopathic dilated cardiomyopathy. A population-based study. *Ann Intern Med*, 1992. 117(2): p. 117-23.
8. Lund, L.H., et al., The registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: thirty-first official adult heart transplant report--2014; focus theme: retransplantation. *J Heart Lung Transplant*, 2014. 33(10): p. 996-1008.

9. Manolio, T.A., et al., Prevalence and etiology of idiopathic dilated cardiomyopathy (summary of a National Heart, Lung, and Blood Institute workshop. *Am J Cardiol*, 1992. 69(17): p. 1458-66.
10. Devereux, R.B., et al., A population-based assessment of left ventricular systolic dysfunction in middle-aged and older adults: the Strong Heart Study. *Am Heart J*, 2001. 141(3): p. 439-46.
11. Roberts, A.M., et al., Integrated allelic, transcriptional, and phenomic dissection of the cardiac effects of titin truncations in health and disease. *Sci Transl Med*, 2015. 7(270): p. 270ra6.
12. McNally, E.M., J.R. Golbus, and M.J. Puckelwartz, Genetic mutations and mechanisms in dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest*, 2013. 123(1): p. 19-26.
13. Henry, W.L., J.M. Gardin, and J.H. Ware, Echocardiographic measurements in normal subjects from infancy to old age. *Circulation*, 1980. 62(5): p. 1054-61.
14. Sousa, P.A., et al., Role of cardiac multidetector computed tomography in the exclusion of ischemic etiology in heart failure patients. *Rev Port Cardiol*, 2014. 33(10): p. 629-36.
15. Chrysohoou, C., M. Greenberg, and C. Stefanadis, Non-invasive methods in differentiating ischaemic from non-ischaemic cardiomyopathy. A review paper. *Acta Cardiol*, 2006. 61(4): p. 454-62.
16. Mestroni, L., et al., Guidelines for the study of familial dilated cardiomyopathies. Collaborative Research Group of the European Human and Capital Mobility Project on Familial Dilated Cardiomyopathy. *Eur Heart J*, 1999. 20(2): p. 93-102.

17. Frohlich, E.D., The fifth Joint National Committee report on the detection, evaluation and treatment of high blood pressure. *J Am Coll Cardiol*, 1993. 22(2): p. 621-2.
18. Maisch, B., Alcohol and the heart. *Herz*, 1996. 21(4): p. 207-12.
19. Guzzo-Merello, G., et al., Natural history and prognostic factors in alcoholic cardiomyopathy. *JACC Heart Fail*, 2015. 3(1): p. 78-86.
20. Walker, C.M., et al., Cardiac complications of oncologic therapy. *Radiographics*, 2013. 33(6): p. 1801-15.
21. Felker, G.M., et al., Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy. *N Engl J Med*, 2000. 342(15): p. 1077-84.
22. Abelmann, W.H., Classification and natural history of primary myocardial disease. *Prog Cardiovasc Dis*, 1984. 27(2): p. 73-94.
23. Maron, B.J., et al., Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation*, 2006. 113(14): p. 1807-16.
24. Arbustini, E., et al., The MOGE(S) classification for a phenotype-genotype nomenclature of cardiomyopathy: endorsed by the World Heart Federation. *J Am Coll Cardiol*, 2013. 62(22): p. 2046-72.
25. Elliott, P.M., Classification of cardiomyopathies: evolution or revolution? *J Am Coll Cardiol*, 2013. 62(22): p. 2073-4.

26. Holubarsch, C., et al., Existence of the Frank-Starling mechanism in the failing human heart. Investigations on the organ, tissue, and sarcomere levels. *Circulation*, 1996. 94(4): p. 683-9.
27. Moolman, J.A., et al., A newly created splice donor site in exon 25 of the MyBP-C gene is responsible for inherited hypertrophic cardiomyopathy with incomplete disease penetrance. *Circulation*, 2000. 101(12): p. 1396-402.
28. Marston, S., et al., Evidence from human myectomy samples that MYBPC3 mutations cause hypertrophic cardiomyopathy through haploinsufficiency. *Circ Res*, 2009. 105(3): p. 219-22.
29. Fuster, V., et al., The natural history of idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol*, 1981. 47(3): p. 525-31.
30. Mestroni, L., et al., Clinical and pathologic study of familial dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol*, 1990. 65(22): p. 1449-53.
31. Michels, V.V., D.J. Driscoll, and F.A. Miller, Jr., Familial aggregation of idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol*, 1985. 55(9): p. 1232-3.
32. Pongpanich, B. and S. Isaraprasart, Congestive cardiomyopathy in infants and children. Clinical features and natural history. *Jpn Heart J*, 1986. 27(1): p. 11-5.
33. Valantine, H.A., et al., Frequency of familial nature of dilated cardiomyopathy and usefulness of cardiac transplantation in this subset. *Am J Cardiol*, 1989. 63(13): p. 959-63.
34. Vincenzo Fragola, P., et al., Familial idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am Heart J*, 1988. 115(4): p. 912-4.

35. Griffin, M.L., et al., Dilated cardiomyopathy in infants and children. *J Am Coll Cardiol*, 1988. 11(1): p. 139-44.
36. Michels, V.V., et al., The frequency of familial dilated cardiomyopathy in a series of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med*, 1992. 326(2): p. 77-82.
37. McKenna, C.J., et al., Idiopathic dilated cardiomyopathy: familial prevalence and HLA distribution. *Heart*, 1997. 77(6): p. 549-52.
38. Goerss, J.B., et al., Frequency of familial dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J*, 1995. 16 Suppl O: p. 2-4.
39. Grunig, E., et al., Frequency and phenotypes of familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*, 1998. 31(1): p. 186-94.
40. Baig, M.K., et al., Familial dilated cardiomyopathy: cardiac abnormalities are common in asymptomatic relatives and may represent early disease. *J Am Coll Cardiol*, 1998. 31(1): p. 195-201.
41. Mestroni, L., et al., Familial dilated cardiomyopathy: evidence for genetic and phenotypic heterogeneity. Heart Muscle Disease Study Group. *J Am Coll Cardiol*, 1999. 34(1): p. 181-90.
42. Monserrat, L., et al., [Familial dilated cardiomyopathy in patients transplanted for idiopathic dilated cardiomyopathy]. *Rev Esp Cardiol*, 2002. 55(7): p. 725-32.
43. Michels, V.V., et al., Frequency of development of idiopathic dilated cardiomyopathy among relatives of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol*, 2003. 91(11): p. 1389-92.

44. Mahon, N.G., et al., Echocardiographic evaluation in asymptomatic relatives of patients with dilated cardiomyopathy reveals preclinical disease. *Ann Intern Med*, 2005. 143(2): p. 108-15.
45. Herman, D.S., et al., Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med*, 2012. 366(7): p. 619-28.
46. Hershberger, R.E. and J.D. Siegfried, Update 2011: clinical and genetic issues in familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*, 2011. 57(16): p. 1641-9.
47. Pugh, T.J., et al., The landscape of genetic variation in dilated cardiomyopathy as surveyed by clinical DNA sequencing. *Genet Med*, 2014. 16(8): p. 601-8.
48. Burkett, E.L. and R.E. Hershberger, Clinical and genetic issues in familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*, 2005. 45(7): p. 969-81.
49. Crispell, K.A., et al., Clinical profiles of four large pedigrees with familial dilated cardiomyopathy: preliminary recommendations for clinical practice. *J Am Coll Cardiol*, 1999. 34(3): p. 837-47.
50. Crispell, K.A., et al., Periodic rescreening is indicated for family members at risk of developing familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*, 2002. 39(9): p. 1503-7.
51. Michels, V.V., et al., Progression of familial and non-familial dilated cardiomyopathy: long term follow up. *Heart*, 2003. 89(7): p. 757-61.
52. Kushner, J.D., et al., Clinical characteristics of 304 kindreds evaluated for familial dilated cardiomyopathy. *J Card Fail*, 2006. 12(6): p. 422-9.

53. Fatkin, D., et al., Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease. *N Engl J Med*, 1999. 341(23): p. 1715-24.
54. Hershberger, R.E., et al., Progress with genetic cardiomyopathies: screening, counseling, and testing in dilated, hypertrophic, and arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Circ Heart Fail*, 2009. 2(3): p. 253-61.
55. Hershberger, R.E., et al., Genetic evaluation of cardiomyopathy--a Heart Failure Society of America practice guideline. *J Card Fail*, 2009. 15(2): p. 83-97.
56. van Spaendonck-Zwarts, K.Y., et al., Genetic analysis in 418 index patients with idiopathic dilated cardiomyopathy: overview of 10 years' experience. *Eur J Heart Fail*, 2013. 15(6): p. 628-36.
57. Parks, S.B., et al., Lamin A/C mutation analysis in a cohort of 324 unrelated patients with idiopathic or familial dilated cardiomyopathy. *Am Heart J*, 2008. 156(1): p. 161-9.
58. Hershberger, R.E., et al., Coding sequence rare variants identified in MYBPC3, MYH6, TPM1, TNNC1, and TNNI3 from 312 patients with familial or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet*, 2010. 3(2): p. 155-61.
59. Hershberger, R.E., et al., Coding sequence mutations identified in MYH7, TNNT2, SCN5A, CSRP3, LBD3, and TCAP from 313 patients with familial or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Clin Transl Sci*, 2008. 1(1): p. 21-6.
60. Lakdawala, N.K., et al., Genetic testing for dilated cardiomyopathy in clinical practice. *J Card Fail*, 2012. 18(4): p. 296-303.

61. Garcia-Pavia, P., et al., Genetics in dilated cardiomyopathy. *Biomark Med*, 2013. 7(4): p. 517-33.
62. Authors/Task Force, m., et al., 2014 ESC Guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy: the Task Force for the Diagnosis and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*, 2014. 35(39): p. 2733-79.
63. Ware, J.S., A.M. Roberts, and S.A. Cook, Next generation sequencing for clinical diagnostics and personalised medicine: implications for the next generation cardiologist. *Heart*, 2012. 98(4): p. 276-81.
64. Metzker, M.L., Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet*, 2010. 11(1): p. 31-46.
65. Palmucci, L., et al., Dystrophinopathy expressing as either cardiomyopathy or Becker dystrophy in the same family. *Neurology*, 2000. 54(2): p. 529-30.
66. Sikkema-Raddatz, B., et al., Targeted next-generation sequencing can replace Sanger sequencing in clinical diagnostics. *Hum Mutat*, 2013. 34(7): p. 1035-42.
67. D'Argenio, V., et al., DNA sequence capture and next-generation sequencing for the molecular diagnosis of genetic cardiomyopathies. *J Mol Diagn*, 2014. 16(1): p. 32-44.
68. Villard, E., et al., A genome-wide association study identifies two loci associated with heart failure due to dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J*, 2011. 32(9): p. 1065-76.
69. Norton, N., et al., Genome-wide studies of copy number variation and exome sequencing identify rare variants in BAG3 as a cause of dilated cardiomyopathy. *Am J Hum Genet*, 2011. 88(3): p. 273-82.

70. Homma, S., et al., BAG3 deficiency results in fulminant myopathy and early lethality. *Am J Pathol*, 2006. 169(3): p. 761-73.
71. Selcen, D., et al., Mutation in BAG3 causes severe dominant childhood muscular dystrophy. *Ann Neurol*, 2009. 65(1): p. 83-9.
72. Odgerel, Z., et al., Inheritance patterns and phenotypic features of myofibrillar myopathy associated with a BAG3 mutation. *Neuromuscul Disord*, 2010. 20(7): p. 438-42.
73. Lee, H.C., et al., BAG3-related myofibrillar myopathy in a Chinese family. *Clin Genet*, 2012. 81(4): p. 394-8.
74. Arimura, T., et al., Dilated cardiomyopathy-associated BAG3 mutations impair Z-disc assembly and enhance sensitivity to apoptosis in cardiomyocytes. *Hum Mutat*, 2011. 32(12): p. 1481-91.
75. Hishiya, A., T. Kitazawa, and S. Takayama, BAG3 and Hsc70 interact with actin capping protein CapZ to maintain myofibrillar integrity under mechanical stress. *Circ Res*, 2010. 107(10): p. 1220-31.
76. Feldman, A.M., et al., Decreased levels of BAG3 in a family with a rare variant and in idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Cell Physiol*, 2014. 229(11): p. 1697-702.
77. Franaszczyk, M., et al., The BAG3 gene variants in Polish patients with dilated cardiomyopathy: four novel mutations and a genotype-phenotype correlation. *J Transl Med*, 2014. 12: p. 192.
78. Chi, Y.H., Z.J. Chen, and K.T. Jeang, The nuclear envelopathies and human diseases. *J Biomed Sci*, 2009. 16: p. 96.

79. Puckelwartz, M. and E.M. McNally, Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Handb Clin Neurol*, 2011. 101: p. 155-66.
80. Bonne, G. and S. Quijano-Roy, Emery-Dreifuss muscular dystrophy, laminopathies, and other nuclear envelopathies. *Handb Clin Neurol*, 2013. 113: p. 1367-76.
81. Bonne, G., et al., Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet*, 1999. 21(3): p. 285-8.
82. Carboni, N., et al., Cardiac and muscle imaging findings in a family with X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*, 2012. 22(2): p. 152-8.
83. Rakovec, P., et al., Cardiac involvement in Emery-Dreifuss muscular dystrophy: role of a diagnostic pacemaker. *Pacing Clin Electrophysiol*, 1995. 18(9 Pt 1): p. 1721-4.
84. Cattin, M.E., A. Muchir, and G. Bonne, 'State-of-the-heart' of cardiac laminopathies. *Curr Opin Cardiol*, 2013. 28(3): p. 297-304.
85. Finsterer, J., et al., Dilated, arrhythmogenic cardiomyopathy in emery-dreifuss muscular dystrophy due to the emerin splice-site mutation c.449 + 1G>A. *Cardiology*, 2015. 130(1): p. 48-51.
86. Wicklund, M.P., The muscular dystrophies. *Continuum (Minneap Minn)*, 2013. 19(6 Muscle Disease): p. 1535-70.
87. Golzio, P.G., A. Chiribiri, and F. Gaita, 'Unexpected' sudden death avoided by implantable cardioverter defibrillator in Emery Dreifuss patient. *Europace*, 2007. 9(12): p. 1158-60.
88. Dell'Amore, A., et al., Heart transplantation in patients with Emery-Dreifuss muscular dystrophy: case reports. *Transplant Proc*, 2007. 39(10): p. 3538-40.

89. Emery, A.E., Emery-Dreifuss syndrome. *J Med Genet*, 1989. 26(10): p. 637-41.
90. Meinke, P., et al., Abnormal proliferation and spontaneous differentiation of myoblasts from a symptomatic female carrier of X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*, 2015. 25(2): p. 127-36.
91. Karkkainen, S., et al., Novel mutations in the lamin A/C gene in heart transplant recipients with end stage dilated cardiomyopathy. *Heart*, 2006. 92(4): p. 524-6.
92. Garcia-Pavia, P., et al., Desmosomal protein gene mutations in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy undergoing cardiac transplantation: a clinicopathological study. *Heart*, 2011. 97(21): p. 1744-52.
93. Maiellaro-Rafferty, K., et al., Altered regional cardiac wall mechanics are associated with differential cardiomyocyte calcium handling due to nebulin mutations in preclinical inherited dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*, 2013. 60: p. 151-60.
94. Lefeber, D.J., et al., Autosomal recessive dilated cardiomyopathy due to DOLK mutations results from abnormal dystroglycan O-mannosylation. *PLoS Genet*, 2011. 7(12): p. e1002427.
95. Girolami, F., et al., Clinical features and outcome of hypertrophic cardiomyopathy associated with triple sarcomere protein gene mutations. *J Am Coll Cardiol*, 2010. 55(14): p. 1444-53.
96. Quarta, G., et al., Familial evaluation in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: impact of genetics and revised task force criteria. *Circulation*, 2011. 123(23): p. 2701-9.

97. Garcia-Pavia, P., et al., Genetic basis of end-stage hypertrophic cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail*, 2011. 13(11): p. 1193-201.
98. Hershberger, R.E., D.J. Hedges, and A. Morales, Dilated cardiomyopathy: the complexity of a diverse genetic architecture. *Nat Rev Cardiol*, 2013. 10(9): p. 531-47.
99. George, A.L., Jr., Use of contemporary genetics in cardiovascular diagnosis. *Circulation*, 2014. 130(22): p. 1971-80.
100. Biswas, A., et al., Next generation sequencing in cardiomyopathy: towards personalized genomics and medicine. *Mol Biol Rep*, 2014. 41(8): p. 4881-8.
101. Haas, J., et al., Atlas of the clinical genetics of human dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J*, 2015. 36(18): p. 1123-35a.
102. Kapplinger, J.D., et al., Distinguishing arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia-associated mutations from background genetic noise. *J Am Coll Cardiol*, 2011. 57(23): p. 2317-27.
103. van Rijsingen, I.A., et al., Risk factors for malignant ventricular arrhythmias in lamin a/c mutation carriers a European cohort study. *J Am Coll Cardiol*, 2012. 59(5): p. 493-500.
104. Diegoli, M., et al., Diagnostic work-up and risk stratification in X-linked dilated cardiomyopathies caused by dystrophin defects. *J Am Coll Cardiol*, 2011. 58(9): p. 925-34.
105. van Rijsingen, I.A., et al., Lamin A/C mutation is independently associated with an increased risk of arterial and venous thromboembolic complications. *Int J Cardiol*, 2013. 168(1): p. 472-7.

106. van Rijsingen, I.A., et al., Outcome in phospholamban R14del carriers: results of a large multicentre cohort study. *Circ Cardiovasc Genet*, 2014. 7(4): p. 455-65.
107. Gonzalez-Vilchez, F., et al., Spanish Heart Transplantation Registry. 25th official report of the Spanish Society of Cardiology Working Group on Heart Failure and Heart Transplantation (1984-2013). *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*, 2014. 67(12): p. 1039-51.